

Die immunogene Wirkung
von Staphylokokken-Enterotoxin B
nach Vernetzung bei aerogener
und parenteraler Verabreichung
an Kaninchen

Jutta Maschefsky

1981

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Die immunogene Wirkung von Staphylokokken-Enterotoxin B
nach Vernetzung bei aerogener und parenteraler Verab-
reichung an Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Jutta Maschefsky

aus

Mannheim

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Prof. Dr. B. Gedek

Tag der Promotion: 24. Juli 1981



1.	Einleitung	1
2.	Einleitung	2
2.1	Einleitung zum ersten Teil	2
2.2	Einleitung zum zweiten Teil	3
2.2.1	Einleitung zum ersten Teil	3
2.2.2	Einleitung zum zweiten Teil	3
2.3	Einleitung	10
2.3.1	Einleitung zum ersten Teil	10
2.3.2	Einleitung zum zweiten Teil	10
2.3.3	Einleitung	14
2.3.3.1	Einleitung	12
3.	Einleitung Meinen Eltern	16
3.1	Einleitung zum ersten Teil	16
3.2	Einleitung zum zweiten Teil	16
3.3	Einleitung	16
3.3.1	Einleitung zum ersten Teil	16
3.3.2	Einleitung zum zweiten Teil	16
3.3.3	Einleitung	16
3.3.3.1	Einleitung	16
3.3.3.2	Einleitung	16
3.3.3.3	Einleitung	16
3.3.3.4	Einleitung	16
3.3.3.5	Einleitung	16
3.3.3.6	Einleitung	16
3.3.3.7	Einleitung	16
3.3.3.8	Einleitung	16
3.3.3.9	Einleitung	16
3.3.3.10	Einleitung	16
3.3.3.11	Einleitung	16
3.3.3.12	Einleitung	16
3.3.3.13	Einleitung	16
3.3.3.14	Einleitung	16
3.3.3.15	Einleitung	16
3.3.3.16	Einleitung	16
3.3.3.17	Einleitung	16
3.3.3.18	Einleitung	16
3.3.3.19	Einleitung	16
3.3.3.20	Einleitung	16
3.3.3.21	Einleitung	16
3.3.3.22	Einleitung	16
3.3.3.23	Einleitung	16
3.3.3.24	Einleitung	16
3.3.3.25	Einleitung	16
3.3.3.26	Einleitung	16
3.3.3.27	Einleitung	16
3.3.3.28	Einleitung	16
3.3.3.29	Einleitung	16
3.3.3.30	Einleitung	16
3.3.3.31	Einleitung	16
3.3.3.32	Einleitung	16
3.3.3.33	Einleitung	16
3.3.3.34	Einleitung	16
3.3.3.35	Einleitung	16
3.3.3.36	Einleitung	16
3.3.3.37	Einleitung	16
3.3.3.38	Einleitung	16
3.3.3.39	Einleitung	16
3.3.3.40	Einleitung	16
3.3.3.41	Einleitung	16
3.3.3.42	Einleitung	16
3.3.3.43	Einleitung	16
3.3.3.44	Einleitung	16
3.3.3.45	Einleitung	16
3.3.3.46	Einleitung	16
3.3.3.47	Einleitung	16
3.3.3.48	Einleitung	16
3.3.3.49	Einleitung	16
3.3.3.50	Einleitung	16
3.3.3.51	Einleitung	16
3.3.3.52	Einleitung	16
3.3.3.53	Einleitung	16
3.3.3.54	Einleitung	16
3.3.3.55	Einleitung	16
3.3.3.56	Einleitung	16
3.3.3.57	Einleitung	16
3.3.3.58	Einleitung	16
3.3.3.59	Einleitung	16
3.3.3.60	Einleitung	16
3.3.3.61	Einleitung	16
3.3.3.62	Einleitung	16
3.3.3.63	Einleitung	16
3.3.3.64	Einleitung	16
3.3.3.65	Einleitung	16
3.3.3.66	Einleitung	16
3.3.3.67	Einleitung	16
3.3.3.68	Einleitung	16
3.3.3.69	Einleitung	16
3.3.3.70	Einleitung	16
3.3.3.71	Einleitung	16
3.3.3.72	Einleitung	16
3.3.3.73	Einleitung	16
3.3.3.74	Einleitung	16
3.3.3.75	Einleitung	16
3.3.3.76	Einleitung	16
3.3.3.77	Einleitung	16
3.3.3.78	Einleitung	16
3.3.3.79	Einleitung	16
3.3.3.80	Einleitung	16
3.3.3.81	Einleitung	16
3.3.3.82	Einleitung	16
3.3.3.83	Einleitung	16
3.3.3.84	Einleitung	16
3.3.3.85	Einleitung	16
3.3.3.86	Einleitung	16
3.3.3.87	Einleitung	16
3.3.3.88	Einleitung	16
3.3.3.89	Einleitung	16
3.3.3.90	Einleitung	16
3.3.3.91	Einleitung	16
3.3.3.92	Einleitung	16
3.3.3.93	Einleitung	16
3.3.3.94	Einleitung	16
3.3.3.95	Einleitung	16
3.3.3.96	Einleitung	16
3.3.3.97	Einleitung	16
3.3.3.98	Einleitung	16
3.3.3.99	Einleitung	16
3.3.3.100	Einleitung	16

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Staphylokokken-Enterotoxine (SE)	2
2.2	Vernetzung von Proteinen	3
2.2.1	Allgemeines	3
2.2.2	Anwendungsmöglichkeiten	4
2.3	Aerosole	10
2.3.1	Begriffsbestimmung der Aerosole	10
2.3.2	Verwendung von Aerosolen in der Medizin	14
2.3.2.1	Therapie	14
2.3.2.2	Immunisierung	14
3.	Eigene Untersuchungen	19
3.1	Herstellung von vernetztem Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)	19
3.1.1	Material	19
3.1.2	Methodik	21
3.1.2.1	Vorversuch zur Herstellung von SE-B-Oligo- bzw. Polymeren durch Vernetzung mit Glutar- aldehyd	21
3.1.2.2	Vernetzung von Eialbumin mit Glutaraldehyd als Modellversuch	22
3.1.2.2.1	Gelfiltration an Ultrogel AcA 34	24
3.1.2.3	Hauptversuch zur Herstellung von Staphylokok- ken-Enterotoxin B-Oligomeren durch Vernetzung mit Glutaraldehyd	27
3.1.2.3.1	Variierung der molaren Verhältnisse von SEB : GluA	27
3.1.2.3.2	Gelfiltration an Sephadex G 50	28
3.1.2.3.3	Gelfiltration an Ultrogel AcA 34	28
3.1.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	30
3.1.2.4	Vorversuch zur Vernetzung von SEB mit Dimethyl- suberimidate (DS)	30
3.1.2.5	Herstellung von SEB-Oligomeren durch Vernetzung mit DS	34
3.1.2.5.1	Gelfiltration an AcA 34	34
3.1.2.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34

3.2	Ergebnisse	38
3.3	Immunisierungsversuche	40
3.3.1	Material	40
3.3.2	Methodik	42
3.3.2.1	Aerogene und parenterale Verabreichung von DS-vernetztem SEB	42
3.3.2.2	Serologische Untersuchungen	48
3.4	Ergebnisse	48
3.5	Herstellung der IgG-Rohfraktion aus Anti-SEB-Antiserum	51
3.5.1	Material	51
3.5.2	Methodik	51
3.6	Ergebnisse	53
4.	Diskussion	55
5.	Zusammenfassung / Summary	61
6.	Literaturverzeichnis	63

1. Einleitung

In den letzten Jahren wurde in vielen Ländern eine beachtliche Zunahme der durch Staphylokokken-Enterotoxine bedingten Lebensmittelvergiftungen registriert. Dies ist zumindest teilweise auf Veränderungen in den Ernährungsgewohnheiten zurückzuführen. Mit der Verbreitung von Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung treffen die Folgen hygienischer Fehler in der Zubereitung und Lagerung von Speisen sehr viel häufiger als früher große Kollektive, so daß auch die Staphylokokken-Enterotoxikose, die aufgrund derartiger Fehler entstehen kann, sich meist als Gruppen- oder sogar Massenerkrankung manifestiert. Zweifellos hat auch die Weiterentwicklung von Nachweisverfahren die Statistik dieser Erkrankungen verändert.

Die Erkrankung verläuft zwar selten tödlich, macht jedoch die Betroffenen weitgehend handlungsunfähig, so daß Überlegungen bestehen, Personenkreise, die in lebenswichtigen bzw. in für das Allgemeinwohl entscheidenden Bereichen tätig sind, vor derartigen Erkrankungen zu schützen. Abgesehen davon, daß die Prophylaxe in der Behandlung von Lebensmitteln einsetzen muß, wurde auch an die Immunisierung dieser Personenkreise gedacht. Aus verschiedenen Gründen hat man - wie auch bei anderen Erkrankungen - die Immunisierung mit Aerosolen in Betracht gezogen.

Zu den Vorteilen der aerogenen Immunisierung zählt vor allem die Möglichkeit, größere Kollektive arbeitssparend zu impfen und injektionsbedingte Komplikationen zu vermeiden.

In dieser Arbeit sollte die nach aerogener Applikation von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) induzierte Immunantwort mit derjenigen nach parenteraler Injektion am Kaninchen verglichen werden. Dazu sollte außerdem SEB zu oligomeren, löslichen Konjugaten vernetzt werden mit der Absicht, einerseits das Gift zu detoxifizieren und andererseits seine Resorption in Abhängigkeit von der Größe und vom Diffusionskoeffizienten des Moleküls im Hinblick auf eine bessere Immunantwort zu steigern.

2. Schrifttum

2.1 Staphylokokken-Enterotoxine (SE)

SE sind wasserlösliche, hauptsächlich von koagulasepositiven *Staphylococcus aureus*-Stämmen gebildete Proteine (BERGDOLL, 1970 und 1972). Die ohne Zell-Lysis freigesetzten SE bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette mit Molekulargewichten - je nach Typ - zwischen 27 800 und 34 100 dalton und werden gemäß der klassischen Einteilung der Bakteriengifte als Ekto-toxine bezeichnet (MINOR und MARTH, 1976). Ihre Eiweißstruktur befähigt sie zur Reaktion mit spezifischen Antikörpern (BERGDOLL, 1970), was zur Differenzierung in verschiedene SE-Typen führte. Bisher wurden sechs dieser sich serologisch unterscheidenden SE-Arten beschrieben: SEA (CASMAN, 1960), SEB (BERGDOLL et al., 1959), SEC (BERGDOLL et al., 1965), mit den Varianten SEC₁ (BORJA und BERGDOLL, 1967) sowie SEC₂ (AVENA und BERGDOLL, 1967), SED (CASMAN et al., 1967), SEE (BERGDOLL et al., 1971) sowie SEF (THOTA et al., 1973). Bei letztgenanntem SE-Typ wird die Zugehörigkeit zur Enterotoxingruppe allerdings angezweifelt (MINOR und MARTH, 1976). Ein von BERGDOLL und seinen Mitarbeitern erst kürzlich nachgewiesener neuer SE-Typ wird daher als SEF bezeichnet (BERGDOLL, 1980). Außer diesen genannten Staphylokokken-Enterotoxinen existieren jedoch, wie mit Affenfütterungsversuchen (SURGALLA et al., 1953) festgestellt wurde, weitere, bisher noch nicht gereinigte und serologisch definierte SE-Typen.

Beim Menschen rufen die SE bei oraler Aufnahme nach einer Inkubationszeit von einer bis sechs Stunden (DANGERFIELD, 1973) Erbrechen und meistens auch Durchfall hervor (BERGDOLL, 1970; 1972). Als weitere möglichen Symptome wären Übelkeit, Schwindelgefühl, Speichelfluß, Kopfschmerzen, abdominale Krämpfe, Muskelkrämpfe, sowie in seltenen Fällen Fieber bzw. subnormale Temperaturen und Blutdruckabfall anzuführen. Trotz enormer gesundheitlicher Störungen, die je nach Konstitution der betroffenen Personen sogar zu schockbedingten Kreislaufstörungen führen können, sind Todesfälle kaum zu verzeichnen. Der

Krankheitsverlauf ist akut und nach 24-72 Stunden beendet (ANGELOTTI, 1969; BERGDOLL 1970 und 1972; DANGERFIELD, 1973).

An Freiwilligen wurden bei 50 % der Versuchspersonen die typischen Krankheiterscheinungen ausgelöst, wenn sie pro kg Körpergewicht 0,14 µg Toxin, d.h. ca. 10 µg pro Person aufgenommen hatten (DANGERFIELD, 1973). Bei besonders Empfindlichen (BERGDOLL, 1970) kann die Wirkung auch schon nach 1 µg SE pro Person auftreten. Normalerweise treten derartige Intoxikationen nach Verzehr von Lebensmitteln auf, die enterotoxinbildende Staphylokokken enthalten. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit der Intoxikation in Laboratorien, in denen SE produziert bzw. damit gearbeitet wird. In diesen Fällen werden die SE meist als Aerosole eingeatmet. Zur Vermeidung gesundheitlicher Schädigungen der Mitarbeiter in derartigen Institutionen wäre neben Entgiftungsverfahren auch die Schutzimpfung als eine der Maßnahmen zur Prophylaxe in Erwägung zu ziehen.

Für grundlegende Untersuchungen auf dem Gebiet der SE wurde bisher häufig SEB herangezogen, dessen Aminosäuresequenz 1970 von HUANG und BERGDOLL völlig aufgeklärt wurde. Für diese Arbeit von Interesse ist vor allem die Stellung der antigenen und der toxischen Komponente. Durch vergleichende Untersuchungen (BERGDOLL et al., 1973 und HUANG et al., 1975) an anderen Enterotoxintypen kann davon ausgegangen werden, daß der Hauptanteil der antigenen Komponente sich in der Nähe der Position 92 befindet, während die toxische Komponente in der Nähe von Position 112 lokalisiert zu sein scheint.

2.2 Vernetzung von Proteinen

2.2.1 Allgemeines

Da im Rahmen dieser Arbeit der Immunisierungseffekt von vernetztem SEB unterschiedlichen Polymerisierungsgrades geprüft werden sollte, war die Kenntnis der Grundlagen von Vernetzungsvorgängen eine Voraussetzung der Experimente.

Proteine sind Biopolymere, deren Molekulargewicht aufgrund willkürlicher Festsetzung größer als 5000 ist. Sie haben wichtige Funktionen im Zellgefüge, wie beispielsweise in der Regulierung des Stoffwechsels, und spielen eine wesentliche Rolle bei immunologischen Schutz- und Abwehrvorgängen der Lebewesen (ASQUITH, 1974).

Proteine können durch chemische Verbindungen quervernetzt werden, ohne daß die komplizierte Raumstruktur sich dabei ändert. Viele bifunktionellen Reagentien besitzen die Fähigkeit, mit bifunktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren zu reagieren (FASOLD, 1971).

Die Konformation der sich in einem Proteinmolekül befindlichen Haupt- und Seitenketten bezeichnet man als Tertiärstruktur. In den bisher aufgeklärten Tertiärstrukturen liegen die meisten hydrophoben Seitenketten unter Wasserausschluß im Inneren, während die ionisierbaren und polaren Seitenketten an der Moleküloberfläche in Kontakt mit der Wasserhülle stehen. Diese Gruppe ist substituierenden chemischen Reaktionen zugänglich, und es besteht die Möglichkeit, Reaktionen mit bifunktionellen Reagentien durchzuführen und auf diese Art künstliche Quervernetzungen in das Protein einzufügen (ZAHN 1955; 1960).

2.2.2 Anwendungsmöglichkeiten

1951 berichteten CAMPBELL, LUESCHER und LERMAN bereits von der erfolgreichen Insolubilisierung von Proteinen mittels Aminocellulose. Es sollte ein Immunadsorbens hergestellt werden, das mit spezifischen Antikörpern einen Komplex bildet, der aus löslichem Antikörper und unlöslichem Antigen besteht und durch Zentrifugation getrennt werden kann. Zu diesem Zweck wurde kristallines Rinderalbumin mit diazotisierter p-Aminobenzylcellulose versetzt und der gewonnene Komplex auf seine Wirksamkeit als spezifisches Adsorbens untersucht. Es war möglich, nicht spezifische Serumproteine mit Hilfe von 1%iger Salzlösung wegzuwaschen bzw. die gewünschten Antikörper mittels Säulenchromatographie zu eluieren. Neben der Isolierung

spezifischer Antikörper gelang es auch, eine knapp 90%ige Reinheit des eluierten löslichen Materials nachzuweisen.

Die Eigenschaft polymerisierter Proteine, als Immunadsorbens wirken zu können, wurde vielen wissenschaftlichen Untersuchungen zugrunde gelegt. AVRAMEAS und TERNYNCK (1967) beschrieben die Herstellung biologisch aktiver unlöslicher Proteinpolymere mittels Äthylchloroform und deren Verwendung zur Isolation von Antigenen und Antikörpern. Dieses Verfahren erfuhr 1969 von RADERMECKER und GOODFRIEND eine Modifikation und diente der Absorption von " γ G-Globulin" von DEAE-Serumfraktionen mit geringster unspezifischer Absorption anderer Serumproteine. In weiteren Arbeiten verwendeten AVRAMEAS (1969, 1972) und AVRAMEAS et al. (1967, 1969 und 1971) als Vernetzungsreagenz Glutaraldehyd (GluA), das sie zur Kopplung von Enzymen an Proteine als Reagenz einsetzten und damit ein noch zu einem großen Teil immunologisch wirksames Konjugat erhielten, das auch nach wie vor enzymatische Aktivität aufwies (AVRAMEAS, 1969). Die katalytische Aktivität der enzymmarkierten Proteine ermöglichte die Festlegung der innerzellulären Lokalisation von Antigenen und Antikörpern und die Charakterisierung von Antikörpern nach Immunelektrophoresen. HABEEB (1967) stellte unlösliche Trypsinderivate her, die 70-80 % ihrer Aktivität bewahrten und somit ein Werkzeug zur kontrollierten Verdauung darstellten. Auch die Effektivität, Stabilität und Spezifität von mit GluA vernetzten Proteinen und ihre Wirksamkeit als Immunadsorbentien zur Isolierung von Antikörpern und Antigenen konnte nachgewiesen werden (AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969).

Erythrozyten mit Antigenen gekoppelt stellen eine weitere Möglichkeit dar, geringste Mengen an Antikörpern mittels passivem Hämagglutinationstest zu erkennen. Verschiedene Kopplungsreagenzien wurden in diesem Zusammenhang ausgetestet, wobei GluA als das wirkungsvollste erschien (AVRAMEAS et al., 1969). Im allgemeinen besaßen die mittels GluA gekoppelten Erythrozyten die höchsten Hämagglutinationstitere. Allerdings ist das Vorhandensein freier Aminosäuregruppen Voraussetzung

für den erfolgreichen Einsatz von GluA. Es scheint so, daß freie Aminogruppen wie die ϵ -Aminogruppe des Lysins oder die α -Aminogruppe von N-terminalen Aminosäuren sich mit GluA in Form einer Schiff'schen Base vereinen (AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969; SACHS und WINN, 1970). Nachdem die vernetzten Derivate bei 280 nm eine sehr hohe Absorption aufweisen, läßt sich auf die Bildung einiger zyklischer Formen schließen. Obwohl die Vernetzungsreaktion bei einem pH-Wert, der möglichst im Nahbereich des isoelektrischen Punktes des jeweiligen Proteins liegen sollte, optimal abläuft, hängt die Reaktivität im wesentlichen von der Anzahl der Aminogruppen und/oder von der Konfiguration des Proteinmoleküls ab (AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969).

Glukose Oxidase bzw. Peroxidase z.B. besitzen eine geringe Zahl freier Aminogruppen, wodurch die Vernetzung nicht stark genug ist, um zu unlöslichen Derivaten zu führen. In diesem Fall ist die Anwesenheit eines Trägerproteins, beispielsweise BSA, erforderlich (AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969) oder es muß ein anderes Vernetzungsreagenz, beispielsweise TOD (tetrazotisiertes o-Dianisidin), verwendet werden (AVRAMEAS et al., 1969).

Zur Enzymmarkierung von Antigenen bzw. Antikörpern wird häufig Peroxidase eingesetzt (AVRAMEAS, 1969; AVRAMEAS und GUILBERT, 1972; AVRAMEAS und TERNYNCK, 1971; AVRAMEAS, 1972; SIMON, 1978). Um erfolgreich mit GluA zu koppeln, ist es notwendig, beide Aldehydgruppen des GluA zu besetzen. Die freien Peroxidasegruppen reagieren lediglich mit einer der zwei Glutaraldehydgruppen, und die Konfiguration des erhaltenen Peroxidasederivates erlaubt es nicht, daß die zweite, noch freie Aldehydgruppe mit einem weiteren Peroxidasmolekül reagiert. Es ist notwendig, diese aktive Aldehydgruppe abzusättigen, was mit dem Hinzufügen eines Proteins erreicht wird (AVRAMEAS und TERNYNCK, 1971). Die auf diese Art erhaltenen Konjugate ermöglichen cytochemische und immunohistochemische Untersuchungen (AVRAMEAS und TERNYNCK, 1971; AVRAMEAS, 1972; AVRAMEAS und GUILBERT, 1972). Auch der ELISA-Test (enzyme-linked immunosorbent assay), der ähnlich wie der länger bekannte So-

lid-Phase-Radioimmunoassay funktioniert, basiert auf diesem Prinzip. Enzymmarkiertes Antigen bzw. Antikörper konkurrieren mit dem nicht markierten Antigen bzw. Antikörper einer Probe um die Bindungsstellen des spezifischen Antikörpers oder Antigens. Bisherige Anwendungsmöglichkeiten und Modifikationen des ELISA-Prinzips sind in einem umfassenden Werk von FELDMANN et al. (1975) und in der Arbeit von SCHUURS (1977) zusammengefaßt. Bezogen auf die für diese Arbeit wichtigen SE konnte der ELISA-Test als empfindliches Nachweisverfahren weiterentwickelt werden, wobei eine Nachweisgrenze für SEB von 0,1 ng/ml erreicht wurde (SIMON, 1978).

Eine gewisse Bedeutung haben polymerisierte Proteine bei der Herstellung von Antigenen auch im Hinblick auf die Immuntherapie. Nachdem DRESSER (1961) vermutete, daß polymeres Protein immunogen wirksamer sei als monomeres, vernetzte DAUGHARTY (1969) hochgereinigte spezifische Antikörper mit einem 20fach molaren Überschuß an GluA und stellte antiidiotypische Antikörper her. REICHLIN (1970) zeigte, daß polymere Präparationen von Cytochrom C des Pferdes, des Affens, des Thunfisches, des Känguruhs und des Kaninchens höhere Immunogenität bei Kaninchen aufwiesen, als das korrespondierende monomere Protein.

Im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Allergien (Heuschnupfen) wurden umfassende Untersuchungen angestellt, die die Vernetzung von Graspollenantigenen zum Gegenstand hatten (PATTERSON et al., 1973, 1977; PATTERSON und SUSZKO, 1974, 1976; METZGER et al., 1976). Bei der Isolierung und Charakterisierung der Graspollenantigene wurde eine Fraktion, als Antigen E bezeichnet, ermittelt, das für allergische Reaktionen vom Soforttyp entscheidend sein soll (PATTERSON et al., 1973). Die Polymerisierung dieses Antigens E bewirkt eine Herabsetzung des allergenen Faktors. Die sonst nach Verabreichung störenden Nebeneffekte wie Histaminausschüttung IgE sensitiver Mastzellen und Absorption vom lokalen Injektionsort, die den Einsatz in der gegen Allergien, wie z.B. Heuschnupfen, gerichteten Therapie in der Humanmedizin beträchtlich einschränken, konnte reduziert werden (PATTERSON et al., 1973, 1977; METZGER et al., 1976). Trotz einer 100fachen Senkung der allergenen Komponente

(PATTERSON et al., 1977) behalten die Vernetzungsprodukte ihre antigene Determinante und reagieren auch mit IgG-Gammaglobulinen, die gegen monomeres, also unpolymerisiertes Material ausgebildet wurden.

Eine Auftrennung des Vernetzungsproduktes in verschiedene Vernetzungsstufen erfolgte mit Hilfe der Chromatographie. An Kaninchen zeigte die monomere Substanz (MG 37 800), eine niedermolekular vernetzte Substanz (MG 0,6 - 4 Mill.) und eine höhermolekular vernetzte Substanz (MG 4-20 Mill.) die gleiche antigene Wirksamkeit hinsichtlich des IgG. Unterschiede bestanden in der Ausbildung des IgE, was auch bei der Entstehung von Hautsymptomen zum Ausdruck kam. Das niedermolekulare Vernetzungsprodukt vermittelte eine geringere und verzögerte Hautreaktion (PATTERSON und SUSZKO, 1974). Die Monomere und hochmolekularen Polymere verschwanden im Gegensatz zu den niedermolekularen Polymeren sehr schnell aus dem Gefäßsystem und konnten dann im Urin (Monomere) bzw. in Leber und Milz (hochmolekulare Polymere) nachgewiesen werden (PATTERSON et al., 1973).

Von großer Bedeutung ist außerdem die Stabilität der Polymere. Die Depolymerisierung eines Präparates während einer Therapiephase würde zunehmende Mengen an monomeren Bestandteilen verursachen, die dann bei einem Patienten mit IgE vermittelter Allergie gegen Pollen zum anaphylaktischen Schock führen könnten. Bei der Lagerung fand während der ersten zwei Monate keine Depolymerisierung statt. Eine geringe zunehmende Polymerisierung (weniger als 8%) oder Depolymerisierung (weniger als 7%) konnte nach sechs Monaten beobachtet werden. Außerdem bestand nach der Lagerung keine prozentuale Abweichung in der Präzipitation des polymerisierten Antigen E mit Kaninchenantiserum gegenüber Kontrollproben (PATTERSON et al., 1976).

In Umkehrung der beschriebenen Abnahme von IgE vermittelten allergischen Symptomen durch Verabreichung von vernetztem Antigen E wurde der Versuch unternommen, die Wirkung von IgE auf Mastzellen und Tumormastzellen durch Vernetzung zu steigern bzw. Vergleiche zwischen diesen beiden Zelltypen im Hinblick

auf ihre Reaktion gegenüber vernetztem IgE anzustellen (SEGAL et al., 1977; FEWTRELL und METZGER, 1980). Diesem Gedanken liegt die Tatsache zugrunde, daß monomeres IgE mit seinem Fc-Teil an die Oberfläche von Mastzellen gebunden wird. Durch Kontakt mit Antigenen, die mit dem Fab-Teil des zellgebundenen IgE reagieren, kommt es zur Zellstimulierung und damit zur Ausschüttung von Histamin und Serotonin. Eine intermolekulare Vernetzung des zellgebundenen Antikörpers scheint Voraussetzung für die Auslösung der Exocytose zu sein. Diese intermolekulare Vernetzung muß also nicht zwingend durch ein Antigen hervorgerufen werden, ein bivalenter, gegen IgE gerichteter Antikörper bzw. künstlich aggregiertes IgE oder Fc-Fragmente des IgE sind ebenso in der Lage, eine Reaktion zu induzieren. SEGAL, TAUROG und METZGER (1977) behandelten unter diesem Aspekt IgE mit Dimethylsuberimide und isolierten Monomere, Dimere, Trimere und höhere Polymere aus dem gewonnenen Gemisch. Monomere hatten keine Wirksamkeit, während bereits Dimere eine deutliche Antwort in Form von Zellgranulationen hervorriefen, die nur geringfügig durch Trimere bzw. höhere Polymere gesteigert werden konnte. Im Gegensatz dazu steht die Wirkung von Trimeren bzw. höheren IgE Oligomeren auf basophile Rattenleukämiezellen. Während Dimere nur eine unwesentliche Sekretion erreichten, zeigten die trimeren Präparate einen dreimal größeren Effekt und konnten, um eine 10%ige Histaminfreisetzung zu provozieren, in einer 33mal niedrigeren Konzentration vorhanden sein als Dimere (FEWTRELL und METZGER, 1980). Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei Humanbasophilen erzielen, wobei die Anwesenheit von 30%igem D₂O den Effekt potenzierte.

Mastzellen besitzen jedoch neben IgE-Rezeptoren auch solche für IgG, wobei nur eine geringe Affinität besteht und an diese Rezeptoren auch IgE gebunden werden kann. Nur durch Vernetzung der Liganden war es möglich, genauere Untersuchungen über das Bindungsvermögen von IgG an basophile Rattenleukämiezellen anzustellen. Dies führte auch zu der Erkenntnis, daß IgG auch im vernetzten Zustand und selbst in großen Mengen nicht zur Histaminfreisetzung befähigt ist (SEGAL et al., 1981).

Auch bezüglich Staphylokokken-Enterotoxin fanden Bemühungen statt, eine Beibehaltung der Antigenität bei Reduzierung der Toxizität durch Vernetzung anzustreben, im Hinblick auf eine Verwendung in der klinischen und experimentellen Medizin. Formaldehyd diente als Vernetzungsreagenz, wobei sowohl verschiedene Einwirkzeiten (SILVERMAN et al., 1969), als auch unterschiedliche pH-Bereiche (WARREN et al., 1973; 1974, 1975; SPERO et al., 1975) für die Wirkung des Produkts von Bedeutung waren. Die Fähigkeit von Formaldehyd-inaktiviertem SEB, die Produktion spezifischer Antikörper zu stimulieren, steht in direktem Verhältnis zu dem Grad der Vernetzung. Der höchste Vernetzungsgrad und damit gleichbedeutend die stärkste Immunogenität konnte bei einem pH-Wert der wäßrigen Formaldehydlösung von 7,5 erreicht werden, wobei nur noch 15 % der toxischen Komponente verblieben (WARREN et al., 1973). Staphylokokken-Enterotoxin C₁ reagierte vergleichbar und wurde bei pH 7,5 zu 85 % vernetzt (WARREN et al., 1975). Die enthaltenen hohen Polymere induzierten in Rhesusaffen eine starke humorale Immunantwort, was auf eine höchst wirkungsvolle SEC₁-Toxoidpräparation unter den genannten Bedingungen schließen läßt. Im Gegensatz dazu setzt sich das mit Formaldehyd bei pH 7,5 inaktivierte Enterotoxin A aus hauptsächlich niedermolekularen Polymeren zusammen, die nur eine unbedeutende Immunantwort hervorriefen.

Auch die Mitogenität des SEB, untersucht an Mäusen und Humanlymphozyten, konnte nach Formoldetoxifizierung bei pH 7,5 erhalten werden (SPERO et al., 1975). Nach Auftrennung in Monomere, Dimere und Polymere zeigten die Polymere die höchste Effektivität hinsichtlich ihrer mitogenen Wirksamkeit.

2.3 Aerosole

2.3.1 Begriffsbestimmung der Aerosole

Aerosole, besser aerodisperse Systeme, sind Bezeichnungen aus der Kolloidchemie und bestehen aus in Gasen suspendierten festen oder flüssigen Teilchen. Zur Erzeugung von Immun-

reaktionen muß der das zu inhalierende Antigen enthaltene gasförmige Träger "atembare Luft" sein. Fluorierte Kohlenwasserstoffe als Treibgas sind nur bedingt atembar (DIRNAGL, 1973). Die in dem atembaren gasförmigen Medium dispergierten Partikel müssen schwebefähig sein und dürfen daher eine Größenordnung von 10^{-9} g nicht überschreiten (NÜCKEL, 1958). Daraus ergibt sich ein maximaler Durchmesser von 5 μm . Teilchen größer als 5 μm und schwerer als 10^{-9} g sind nicht schwebefähig und werden als Spray bezeichnet (PICKROTH, 1963). Weitere Parameter sind Entstehungsart, Wirkung und chemische Beschaffenheit (SCHEDLING, 1973).

Für therapeutische bzw. Immunisierungszwecke kommt der künstlichen Aerosolerzeugung besondere Bedeutung zu, die auf drei Grundprinzipien zurückzuführen ist. Bei der ältesten und gebräuchlichsten Methode, dem Atomizerverfahren (DIRNAGL, 1973), wird die zu vernebelnde Flüssigkeit von komprimierter Luft mit einem Druck von 1,5 atü durchströmt, wobei in der Zerstäuberdüse Teile der Flüssigkeit mitgerissen werden. Nach Entspannung auf atmosphärischen Druck bildet sich der sogenannte Primärnebel, der aus einem Gemisch von Tröpfchen verschiedener Größe besteht. Mittels Prallwände und Umlenkung des Nebels kommt es zur Abscheidung der unerwünschten größeren Teilchen, so daß die schwebefähigen Teilchen dann als Sekundärnebel den Atomizer verlassen können.

Die Verneblung nach dem Schleuderverfahren (spinning disc) (HARSTAD et al., 1970) setzt den Gebrauch sogenannter Zentrifugalvernebler (NÜCKEL, 1958) voraus. Die zu vernebelnde Flüssigkeit wird in Achsennähe angesaugt und auf eine mit hoher Geschwindigkeit laufende Scheibe verteilt. Durch die Zentrifugalkraft schießt die Flüssigkeit sofort nach außen und prallt auf entsprechend installierte Flächen auf. Dabei entsteht ein Nebel, der durch die Luftströmung der rotierenden Scheibe nach außen befördert wird.

Die Ultraschallverneblung besitzt den Vorteil der Erzeugung eines weitgehend monodispersen Aerosols sowie einer hohen Ne-

belleistung und Dichte, die im Vergleich zur Düsenverneblung 10mal so hoch ist (DIRNAGL, 1973). Die Ultraschallvernebler bestehen im wesentlichen aus einem piezokeramischen Schwinger, dem hochfrequenter Strom zugeführt wird, wobei eine Umwandlung von elektrischer Energie in mechanische Schwingungen erfolgt. Diese Schwingungen werden entweder direkt oder über eine Kopplungsflüssigkeit auf die zu vernebelnde Flüssigkeit übertragen, wodurch ein sogenannter Schallstrahl gebildet wird, der an der Grenzfläche zur Luft hin einen Sprudel erzeugt. Bei einer gewissen kritischen Abstrahlungsenergie löst sich der Sprudel auf und es entsteht ein Nebel. Trotz bereits genannter Vorteile sind auch dem Ultraschallvernebler Grenzen gesetzt. Es ist z.B. nicht möglich, zähe Flüssigkeiten und Suspensionen nach diesem Prinzip zu vernebeln (DIRNAGL, 1973). Außerdem können chemische Bindungen unter dem Einfluß der hochfrequenten Ultraschallschwingungen (bis zu 800 KHz) aufgebrochen werden (PICKROTH, 1963), wodurch diese Art der Verneblung besonders für bakterielle Impfstoffe in Frage gestellt ist (SCHEFFLER, 1974).

Auch nach der Erzeugung wirken auf das Aerosol zahlreiche Faktoren ein, die zwar bekannt sind, aber oft nicht näher definiert werden können, da es nicht gelingt, in entsprechenden Experimenten die jeweiligen Variablen konstant zu halten (DIMMICK und AKERS, 1969). Für Untersuchungen dieser Einflußfaktoren wurden sogenannte Aerosolkammern angefertigt, die mit einer Vielzahl von Meßgeräten ausgestattet sind (FONTANGES, 1968; LECLEERQ, 1971; FOURNIER, 1975). Hierbei kann man zwischen statischen und dynamischen Systemen unterscheiden. Mit Hilfe von großen Kammern (WOLFE, 1961; MIDDLEBROOK, 1961), die mit dem Aerosol gefüllt werden, bis eine definierte Aerosolkonzentration eingestellt ist, werden Untersuchungen an statischen Aerosolen durchgeführt. Der Konzentrationsabfall und die Verlustrate kann durch Wiederauffangen des Aerosols bestimmt werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dynamischen Aerosolen (DRUETT und MAY, 1952) um kontinuierlich erzeugte Aerosole. Der prinzipielle Aufbau der hierfür verwendeten Kammern wurde erstmals

HENDERSON (1952) beschrieben. Der erzeugte Nebel wird kontinuierlich an dem einen Ende der Kammer ein- und am anderen Ende wieder ausgeführt. Das Aerosol kann dabei angeschlossenen Meßgeräten zugeführt und sogar gleichzeitig sterilfiltriert werden. Zahlreiche Modifikationen (MIDDLEBROOK, 1952; ROESSLER und KAUTTER, 1962; GRIFFITH, 1964; BEARD und EASTERDAY, 1968; FONTANGES, 1968) erlaubten es, Versuchstiere wie Kaninchen, Kälber, Schweine und Affen diesem Apparat luftdicht anzuschließen und damit zwangsweise einer Inhalation auszusetzen. Vor allem in der Sowjetunion wurde dieses dynamische System für Immunisierungsversuche unter Feldverhältnissen herangezogen, wobei die Kammern ein volumenmäßiges Fassungsvermögen von 50 m³ bis zu 869 m³ aufwiesen (SELIVANOW, 1965; SELIVANOW und MARISKOWA, 1969).

Am eigenen Institut wurde ein nach HENDERSON (1952) und NIESSEN et al. (1963) modifizierte vereinfachte Aerosolbox gebaut und Versuche an zwei luftdicht angeschlossenen Kaninchen unternommen. Es wurde festgestellt, daß die Reaktion der beiden Tiere unterschiedlich ausfiel, was auf die Position der Tiere in der Kammer zurückzuführen sein könnte und einen Einsatz auf immunologischem oder therapeutischem Sektor fragwürdig erscheinen läßt (HAMMER et al., 1979).

Der Abscheidungsmechanismus inhalierter Partikel hängt von den physiologischen und chemischen Eigenschaften des Aerosols und von den physiologischen Gegebenheiten des Atmungstraktes ab (MITCHELL, 1960). HATCH (1961) setzte die totale und regionale Abscheidung inhalierter Partikel in Beziehung zur Partikelgröße und der Sedimentationsgeschwindigkeit. Bei einer Tröpfchengröße von 0,5 bis 5,5 μ m, die Voraussetzung für eine Inhalation ist (HATCH und GROSS, 1964), kommt als Resorptionsmechanismus fast nur die Phagozytose in Betracht, die hauptsächlich in den Bronchiolen und den Alveolen stattfindet (DRUETT, 1967). Nach COURTICE und SIMMONDS (1950) können Proteine prinzipiell in der Lunge resorbiert werden, über die Schleimhaut des Atmungstraktes allerdings nur solche mit einem Molekulargewicht unter 70 000 daltons (GRÄNZER, 1968). Nach-

dem jedoch die Alveolen keine Schleimhaut besitzen, müßten auch höhermolekulare Substanzen zur Resorption gelangen können (GRÄNZER, 1968).

Über die tatsächlich retinierte Aerosolmenge ist nur schwer Auskunft zu geben. Schon die inhalierte Menge in Abhängigkeit von der vorgegebenen Dosis ist nur annähernd bestimmbar (DIRNAGL, 1973) und wird mittels Formeln kalkuliert, jedoch nicht exakt errechnet (BOLOTOVSKIJ, 1959; JEMSKY und PHILIPS, 1965; DIMMICK und AKERS, 1969). Nach LECLERQ (1971) und FOURNIER (1975) werden nur etwa 1-4 % des angebotenen Aerosols inhaliert. Davon sollen nur wiederum 18-27 % retiniert werden (SELIVANOV et al., 1975).

2.3.2 Verwendung von Aerosolen in der Medizin

2.3.2.1 Therapie

Im Gegensatz zur Humanmedizin konnte sich in der Veterinärmedizin die Aerosoltherapie nicht durchsetzen. Zwar schlug schon ENIGK (1953) vor, den Lungenwurmbefall von Rindern mit Hilfe eines Aerosols zu behandeln. Die Entwicklung injizierbarer Anthelmintika überholte jedoch diese Therapieform. An Hunde wurden aerogen Sulfonamide, Antibiotika und Vitamin A verabreicht und die Verträglichkeit dieser Arzneimittel überprüft (KANTOR, 1965). Die Inhalation von vernebelten γ -Globulinen beim Kalb führte zu keinem Erfolg, da bei einer in der Praxis realistisch durchführbaren Inhalationszeit von 5 bis 10 Minuten nicht genügend γ -Globulin in die Lungenalveolen gelangte, und daher eine zu geringe Resorption stattfand (GRÄNZER, 1968).

2.3.2.2 Immunisierung

Über die Immunisierung mit Aerosolen wurde sowohl im Zusammenhang mit viral als auch mit bakteriell bedingten Krankheitsformen berichtet.

GAPOTCHKOV und OGARKOV (1972) erzeugten experimentell Virus-

infektionen und stellten fest, daß alle von ihnen untersuchten Erkrankungen unabhängig vom natürlichen Übertragungsmechanismus durch aerogene Infektion hervorgerufen werden können. Die Antikörperbildung nach aerogener Virusverabreichung wurde von MAYHEW und HAHON (1970) fluoreszenz-serologisch und von CATEIGNE (1971) im Hämagglutinationstest bestimmt.

Weitaus mehr Erfahrungen bestehen im Zusammenhang mit bakteriellen Erkrankungen, wobei sowohl Präparationen der Bakterien selbst, als auch der Bakteriumtoxine aerolisiert appliziert wurden.

Als einziges Beispiel für die Verabreichung eines Bakteriums sei hier *Erysipelothrix insidiosa*, der Erreger des Rotlaufs, angeführt. Da es sich beim Rotlauf um eine apneumotrope Infektionskrankheit handelt, erscheint die aerogene Verabfolgung im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit von besonderer Bedeutung. Verschiedene Autoren berichteten über die Möglichkeit, einen Immunschutz auf die aerogene Verwendung von Rotlaufbakterien bei Schweinen zu erreichen (MÖHLMANN, 1972; PRUDNIKOV, 1973; SOLOVJOV und LICHTMANN, 1973; STÜHMER, 1975). Allerdings widerstanden nicht alle Versuchstiere einer Prüfungsbelastung gleichermaßen. Nach Inhalation von Lebendantigen konnten nur gnotobiotische Ferkel eine entsprechend belastbare Immunität erreichen (STÜHMER, 1975). BARTNINKAS (1973) immunisierte Ferkel aerogen gleichzeitig sowohl gegen Salmonellen als auch gegen Rotlauf und erzielte einen ebenso guten Schutz wie nach subcutaner Immunisierung.

Von noch größerem Interesse in bezug auf diese Arbeit sind Erfahrungen, die mit Bakterientoxinen bzw. Toxoiden gesammelt wurden. Schon 1911 bildete SCHEVELEFF beim Hund einen Schutz gegen Diphtherie nach Inhalation des zerstäubten Toxoids aus. Auch bei Meerschweinchen und Kaninchen (SILBERSCHMIDT, 1934; MUROMTSEV et al. (1960) wurden Erfolge beschrieben, die FONTANGES et al. (1970) nicht nachvollziehen konnte. ALEKSANDROV et al. (1960) erhielten nachweisbare Antikörpertiter erst, nachdem nach wiederholter Immunisierung (primärer und

sekundärer) geboostert wurde. Nach 20 Tagen war das Titermaximum erreicht, danach erfolgte ein langsamer Abfall. Während FONTANGES et al. (1970) bei Meerschweinchen und Kaninchen keine Antikörperbildung feststellen konnten, erhielten sie bei Affen zufriedenstellende Immunantworten mit Dosierungen, die sogar niedriger lagen, als die bei subcutaner Applikation benötigten. Beim Menschen erwiesen sich sowohl die serologischen als auch klinischen Reaktionen als dosisabhängig (ALEKSANDROV et al., 1960). Ab einer bestimmten Dosis wurden nicht nur Antikörper, sondern auch allergische Reaktionen verzeichnet, die eine Dosisreduzierung nötig machten. Bei Kindern empfahl MUROMTSEV et al. (1961) als mögliche ungefährliche und wirksame Methode die aerogene Diphtherie-Immunisierung in Form einer Revakzination nach vier- bis sechsmaliger subcutaner Erstimmunisierung.

Eine Reihe von Autoren beschäftigte sich mit der aerogenen Immunisierung gegen Tetanus und verwendete Toxin bzw. Toxoid als Antigen. Bemerkenswert waren die starken tierartlichen Unterschiede hinsichtlich der erzielten Ergebnisse. Meerschweinchen, Schaf, Pferd, Affe und auch der Mensch können prinzipiell eine Immunität ausbilden, wobei die Art der Boosterung eine entscheidende Rolle spielt. YAMASHIROYA et al. (1966) zeigten, daß die Antwort auf die aerogene Boosterung von der Art der Primärreaktion abhängt. Ein Anstieg der Titer erfolgte nur bei primär vorhandenen Antikörpern, dann jedoch um mehrere Titerstufen höher, als nach einmaliger Gabe der Gesamtmenge. Eine optimale Anwendungsmöglichkeit scheint nach FONTANGES et al. (1971) die aerogene Boosterung nach subcutaner Erstvakzination zu sein. Unter diesen Bedingungen wird sogar eine aerogene Massenimmunisierung für möglich gehalten. Auch WHIGLEY et al. (1969) vertrat diese Meinung im Hinblick auf eine mögliche Aerosolboosterung bei der Tetanusschutzimpfung des Menschen, nachdem er nach subcutaner Toxoidinjektion aerogen boosterte und meßbare immunologische Reaktionen im Blutserum erhielt.

Schaf und Pferd verhielten sich in ihrer Reaktion sehr ähnlich.

Bei beiden Tierarten waren durchaus zufriedenstellende Titer zu erreichen, die dazu Anlaß gaben, eine Gewinnung von Hyperimmunseren anzustreben. Dieser Versuch schlug jedoch fehl, da extrem hohe Impfstoffmengen benötigt würden (SCHÜTZLER und DOCKHORN, 1972).

Durch alleinige Inhalation des Toxoids konnte nach SILBERSCHMIDT (1934), BARTLEMA (1966, 1969 und 1972), LECLERQ (1971) bei der Maus keine belastbare Immunität erzielt werden. Dies bezieht sich allerdings hauptsächlich auf die Primärantwort, da BARTLEMA et al. (1969) nach subcutaner Erstimmunisierung mit Aerosolboosterung durchaus einen Effekt erzielte. Bei Verwendung eines bakteriellen Adjuvans, z.B. Zellen von Bordetella pertussis, konnte bei halber Dosis ein 100% besserer Effekt erzielt werden als bei doppelter Dosis ohne Adjuvans, bei der alle Mäuse starben. Außerdem war für die Auslösung des Booster-effektes nach vorheriger Behandlung mit Bordetellen nur noch die alleinige Gabe von Toxoid notwendig. Eine Beziehung zwischen Adjuvans und Toxoiddosis zeigte sich insofern, als bei konstanter Adjuvansmenge die für die Aerosolapplikation erforderliche Dosis um den Faktor 100, die für subcutane Verabreichung erforderliche nur um das 10- bis 20fache erniedrigt werden konnte, um den gleichen Effekt zu erreichen wie mit dem Toxoidalbin. Daraus ist zu schließen, daß der Adjuvanseffekt bei aerogener Immunisierung stärker zum Tragen kommt als bei subcutaner. Neben den Bordetella-pertussis-Zellen erwiesen sich auch Formalin-getötete Klebsiella pneumoniae-Zellen als wirksam, machten aber eine zu lange Inhalationsdauer erforderlich (BARTLEMA et al., 1972).

Der Effekt von Adjuvantien bzw. Immunostimulantien wurde von FONTANGES et al. (1979) ebenfalls an Mäusen näher untersucht. Myxovirus influenza wurde aerogen, Streptococcus pyogenes intranasal und Klebsiella pneumoniae intraperitoneal als Antigene verabreicht. Als stimulierendes Adjuvans wurde Neisseria meningitidis appliziert. Die Ergebnisse zeigten, daß im Falle des Grippevirus das Immunostimulans bei aerogener Inhalation sowohl in flüssiger als auch in Puderform und auch bei intra-

nasaler Verabreichung eine hohe Aktivität aufwies. In Zusammenhang mit dem intranasal applizierten Testkeim *Streptococcus pyogenes* konnte nur die gleiche Applikationsform des Immunostimulans wirksam werden. Alle Formen der Verabreichung des Immunostimulans, außer der aerogenen in Puderform, waren bei gemeinsamer Verabreichung mit *Klebsiella pneumoniae* erfolgreich.

Eine weitere Potenzierung des Effekts kann durch Verabreichung divalenter Vakzine erreicht werden. FONTANGES et al. (1971) ließ Affen Diphtherie- und Tetanus-Toxoid gleichzeitig dreimal im Abstand von 20 Tagen inhalieren. 10 Tage nach der dritten Inhalation erreichte der Diphtherie-Antikörper-Titer sein Maximum, der bis zum 9. Monat zwar wieder abfiel, jedoch noch immer einen Schutz gewährleistete. Gegen Tetanus war noch nach 18 Monaten ein ausreichender Schutz vorhanden. Die potenzierenden Eigenschaften der gemeinsamen Applikation konnten zwar im Anfangsstadium durch die vermehrte Bildung von Antikörpern bestätigt werden, das Niveau war jedoch nur 9 Monate zu halten und sank dann auf die üblichen Werte ab.

Informationen über die aerogene Verabreichung von Staphylokokken-Enterotoxinen können in der Literatur kaum erhalten werden. Am eigenen Institut wurden SEA und SEB, sowohl nativ, als auch auch detoxifiziert mit und ohne Adjuvans aerogen an Kaninchen verabreicht und die Ergebnisse mit denen nach subcutaner Injektion verglichen. Es konnten zwar Antikörper erhalten werden, die Ergebnisse waren jedoch nicht zufriedenstellend und denen nach subcutaner Verabreichung unterlegen (HAMMER et al., 1979).

EINÖDER (1979) führte ähnliche Untersuchungen durch, verwendete jedoch ausschließlich natives SEB ohne Adjuvantien. Nach aerogener Immunisierung wurden zwar Antikörper erhalten, die Titerwerte lagen jedoch niedriger als die nach subcutaner Immunisierung. Außerdem sank der Antikörpergehalt nach einer einmonatigen Immunisierungsphase ab.

Es sei darauf hingewiesen, daß ein Teil der Literaturangaben des Kapitels "Aerosole" (2.3) der unveröffentlichten Literaturstudie von PETZOLDT et al. (1975) entnommen wurden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Herstellung von vernetztem Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)

3.1.1 Material

Als zu vernetzendes Staphylokokken-Enterotoxin (SE) wurde Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) aus institutseigener Produktion verwendet. Aus Gründen der Kostenersparnis wurde als Modells substanz für die Vorversuche zur Ermittlung optimaler Vernetzungsbedingungen auch Eialbumin (EA) (Firma Serva, Heidelberg) eingesetzt, das ein dem SEB (28 000) vergleichbares Molekulargewicht von 45 000 dalton aufweist. Vernetzungsreagenzien waren Glutardialdehyd (nachfolgend Glutaraldehyd = GluA genannt) (Fa. Roth, Karlsruhe) reinst, als 25%ige wäßrige Lösung und Dimethylsuberimidate-dihydrochloride (DS) (Sigma Chemie, München).

SEB wurde aus dem Staphylococcus aureus-Stamm 10/275 produziert und über drei Stufen gereinigt. Grundlage für Herstellung und Reinigung bildete die von SCHANTZ et al. (1965) beschriebene Methode, die in langjährigen Versuchen am eigenen Institut modifiziert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde SEB III (dritte Reinigungsstufe) eingesetzt, das u.a. folgende Merkmale aufweist:

pH-Wert: 6,7

Leitfähigkeit: $5,8 \times 10^{-4}$ S

Extinktionsmessungen: E277: 0,125

E280: 0,121 1 : 10 verdünnt

E260: 0,088

E320: 0,050

Faktorbestimmung nach SCHANTZ et al. (1965): $\frac{260}{277} = 0,7$ $\frac{280}{260} = 1,4$

Proteingehalt (LOWRY): 0,85 mg/ml

Toxingehalt (MANCINI): 0,65 mg/ml

Disk-Elektrophorese: Eine Bande bei ca. 28 000 dalton.

Als Puffersysteme wurden verwendet:

<u>Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (PBS):</u>	0,01 m Phosphat, 0,14 m NaCl, pH 7,0
<u>Tris-Puffer:</u>	0,1 m Tris, 0,15 m NaCl, pH 8,0
<u>Tris-Glycin-Puffer (TGP):</u>	0,2 m Tris, 0,5 m Glycin, pH 7,6
<u>Tris-NaCl-Puffer:</u>	0,2 m Tris, mit HCl auf pH 8,5 eingestellt
<u>Elektrophoresepuffer:</u>	0,1 m Borat, 0,1 m Natriumacetat, 0,1 % SDS, mit 1 n NaOH auf pH 8,5 eingestellt

Jeder Puffer wurde mit 0,02%igem Natriumacid versehen, um Bakterienwachstum zu vermeiden.

Zur Durchführung der Säulenchromatographien wurden benötigt:

Eine Säule mit Kühlmantel (Fa. Neumann, München) mit den Abmessungen 2,5 x 70 cm.

Eine Säule mit Kühlmantel und Durchflußadapter (Fa. LKB) mit den Abmessungen 2,5 x 100 cm.

Trennmaterialien:

Geltyp	Perlen- durchmesser	Fraktionier- bereich
Sephadex G 50 fine	(20-80 μ)	(1 500 - 30 000)
Sephadex G 75	(40-120 μ)	(3 000 - 70 000)
Sepharose 6B	(40-210 μ)	(- 4 x 10 ⁻⁶)
Ultrogel AcA 34	(60-140 μ)	(20 000 - 350 000)

Eichproteine (Fa. Serva, Heidelberg)

Ferritin	MG = 400 000
Katalase	MG = 240 000
bovines IgG	MG = 160 000
Albumin aus Rinderserum	MG = 67 000
Albumin aus Hühnerei	MG = 45 000
Chymotrypsinogen A	MG = 25 000
Cytochrom C	MG = 12 400

Zusätzlich wurde 0,02%iges Blue Dextran 2000 (Fa. Pharmacia, Deutschland) zur Bestimmung des Totvolumens V_0 eingesetzt.

Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach DAVIES und STARK (1970) wurden benötigt:

Gel-Stammlösung: 5 % Acrylamid (Fa. Serva, Heidelberg),
0,155 % Biacrylamid (Fa. Merck-Schuchardt),
Elektrophoresepuffer.

Sodium-Dodecylsulfat (SDS) (Fa. Serva, Heidelberg)

Mercaptoäthanol (Fa. Merck-Schuchardt)

Eichkits (Fa. Pharmacia, Deutschland):

Thyroglobulin	MG = 330 000
Ferritin (Half Unit)	MG = 220 000
Albumin aus Rinderserum	MG = 67 000
Catalase	MG = 60 000
Lactat Dehydrogenase	MG = 36 000
Ferritin (Subunit)	MG = 18 500

Weiterhin wurden folgende Substanzen verwendet:

20%ige Glycinlösung zum Abblocken noch reaktiver Gruppen während des Polymerisierungsvorganges mit GluA.

Standardisiertes SEB-Referenztoxin (Fa. Serva, Heidelberg)

Standardisiertes SEB-Antiserum (institutseigene Produktion sowie Fa. Serva, Heidelberg).

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Vorversuch zur Herstellung von SEB-Oligo- bzw. Polymeren durch Vernetzung mit Glutaraldehyd

SEB wurde mit Hilfe von GluA nach dem von PATTERSON et al. (1972) beschriebenen Verfahren vernetzt. Zu diesem Zweck wurden 30 mg Toxin in 3 ml PBS gelöst und eine 1%ige GluA-Lösung im molaren Verhältnis von 1:100 (SEB : GluA) tropfenweise unter ständigem Rühren zugesetzt. Der Polymerisierungsvorgang wurde nach vier Stunden durch Zugabe von 1,87 ml 20%igem Glycin (50 Mol Glycin/1 Mol GluA) unterbrochen. Anschließend wurde der Reaktions-

ansatz für 24 Stunden gegen Tris-Puffer dialysiert, das Retenat bei 6 000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgehebert und bis zum Gebrauch bei -20°C konserviert.

Zur Separierung der verschiedenen Vernetzungsgrade erfolgte eine Gelfiltration an Sepharose 6B. Zu diesem Zweck wurde eine Säule (2,5 x 70 cm) mit dem nach den Angaben des Herstellers (Pharmacia, Deutschland) aufbereiteten Gel gegossen und mit 2,0 ml einer 0,2%igen Dextranlösung das Totvolumen V_0 bestimmt. Anschließend erfolgte eine Kalibrierung mit Proteinen definierter Molekulargewichte.

Vor dem Auftrag auf die Gelmatrix wurde der Toxin- bzw. Proteingehalt im Überstand des Vernetzungsansatzes nach MANCINI und CARBONARA (1968) bzw. LOWRY et al. (1951) bestimmt. Bei der einfachen radialen Immundiffusion nach MANCINI sind die Durchmesser der konzentrisch um die Probenlöcher gebildeten Präzipitate der Toxinkonzentration direkt proportional, so daß nach Erstellung einer Eichkurve (Abb.1) mit Referenztoxin unterschiedlicher Konzentration die Toxingehalte der Proben abgelesen werden können. Das Verfahren nach LOWRY beruht darauf, daß sich das zu bestimmende Protein mit einer anfärbbaren Substanz verbindet. Die Reaktion verläuft in zwei Teilschritten: Das Protein bildet in alkalischer Kupferlösung einen Kupfer-Proteinkomplex, der dann proportional Folinphenolreagenz reduziert. Anschließend erfolgt eine photometrische Messung bei 750 nm. Anhand einer Eichkurve (Abb.2), die mit einem Proteinstandard erstellt wurde, können den gemessenen Werten die entsprechenden Konzentrationen zugeordnet werden.

3.1.2.2 Vernetzung von Eialbumin mit Glutaraldehyd als Modellversuch

Um unnötige Vorversuche mit dem teuren SEB auf ein Minimum zu beschränken, erschien es sinnvoll, systematische Untersuchungen an einer Testsubstanz durchzuführen, die a) im Handel erhältlich ist und b) ein dem SEB (28 000) vergleichbares Molekulargewicht aufweist. Daher wurde Eialbumin (EA) mit einem

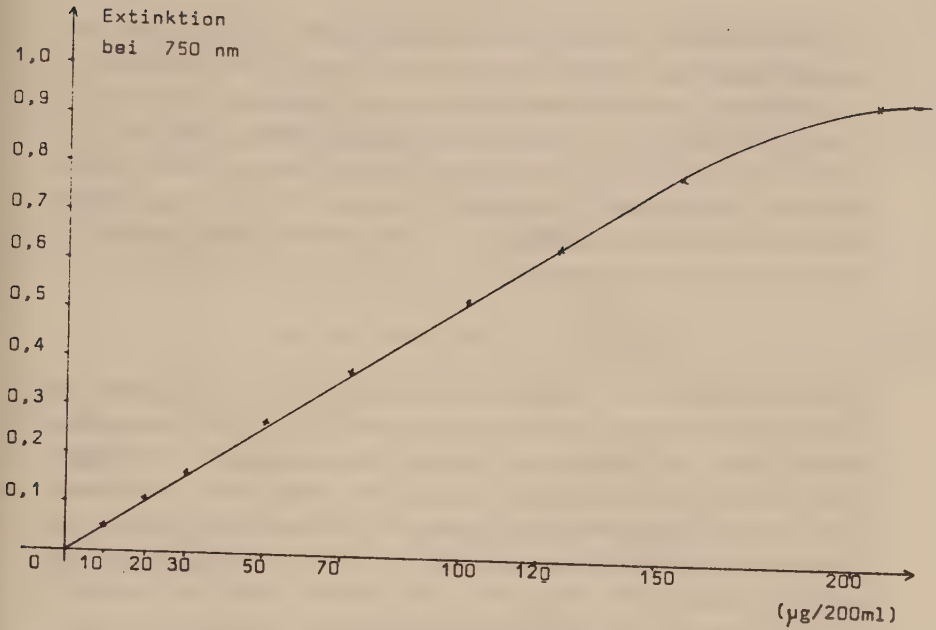


Abb. 1 : Eichkurve für die LOWRY-Proteinbestimmung.
Standardprotein : BSA

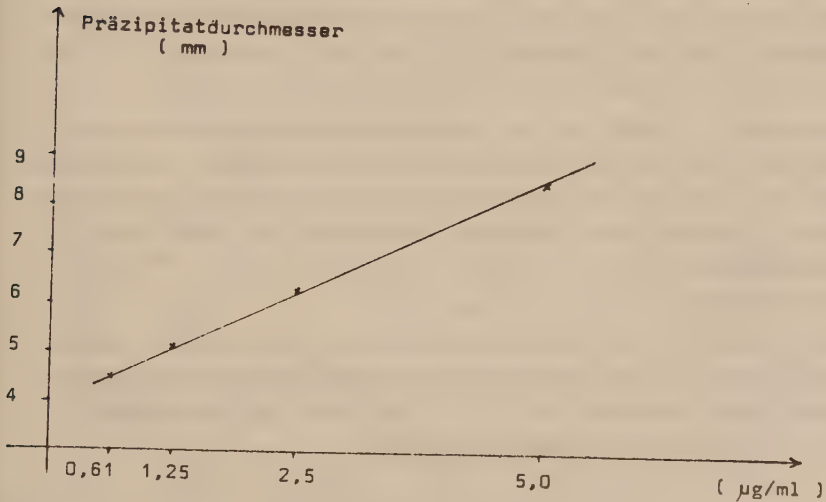


Abb. 2 : Eichkurve für SEB (MANCINI-Test) bei einer
Diffusionszeit von 48 Stunden.

Molekulargewicht von 45 000 dalton eingesetzt und die molaren Verhältnisse von EA : GluA (1:90, 1:30, 1:10) variiert, um optimale Vernetzungsbedingungen zur Gewinnung oligomerer löslicher Konjugate zu ermitteln. Der Vernetzungsvorgang wurde, wie in 3.1.2.1 beschrieben, durch Zusatz eines 50fach molaren Überschusses von Glycin, bezogen auf die eingesetzte GluA-Konzentration, unterbrochen, der Ansatz zentrifugiert und der Überstand abgehebert.

3.1.2.2.1 Gelfiltration an Ultrogel AcA 34

Die Auftrennung von vernetztem EA in Poly- bzw. Oligomere erfolgte durch Gelfiltration an Ultrogel AcA 34. Die verwendete Säule (2,5 x 100) besaß ein totales Säulenvolumen von 490 cm³. Durch Anschluß eines Durchflußadapters durfte das Gelvolumen nur 90 % des Säulenvolumens, also 441 cm³ betragen. Daraus ließ sich die benötigte Menge des Puffers (176 cm³) berechnen, die 40 % des Gelvolumens ausmachte. Gel, Puffer (TGP) und der im Durchflußadapter befindliche Filter wurden ausgiebig entgast, um spätere Luftblasenbildung zu vermeiden. Die Füllung der Säule erfolgte mit einem hydrostatischen Druck von 60 cm. Anschließend wurde das Totvolumen V_0 mit Dextranblau bestimmt und die Gelmatrix mit Hilfe nachfolgender Proteine kalibriert: Ferritin (400 000), bovines IgG (160 000), Eialbumin (45 000) und Chymotrypsinogen (25 000) (Abb.3).

Vernetztes EA wurde auf die geeichte Gelmatrix aufgetragen und durch Elution mit TGP in Poly- bzw. Oligomere aufgetrennt. Die Dokumentation der Proteinprofile erfolgte mit Hilfe eines Uvicord-Systems (LKB Productor, Stockholm) und sämtliche Chromatographien wurden bei einer Temperatur zwischen 2°C und 4°C durchgeführt.

Abb. 4 zeigt ein für GluA-vernetztes EA repräsentatives Elutionsdiagramm. Die eluierten Fraktionen wurden in der angegebenen Weise vereinigt (Fr. I, II und III) und im Vergleich mit den Referenzproteinen analysiert.

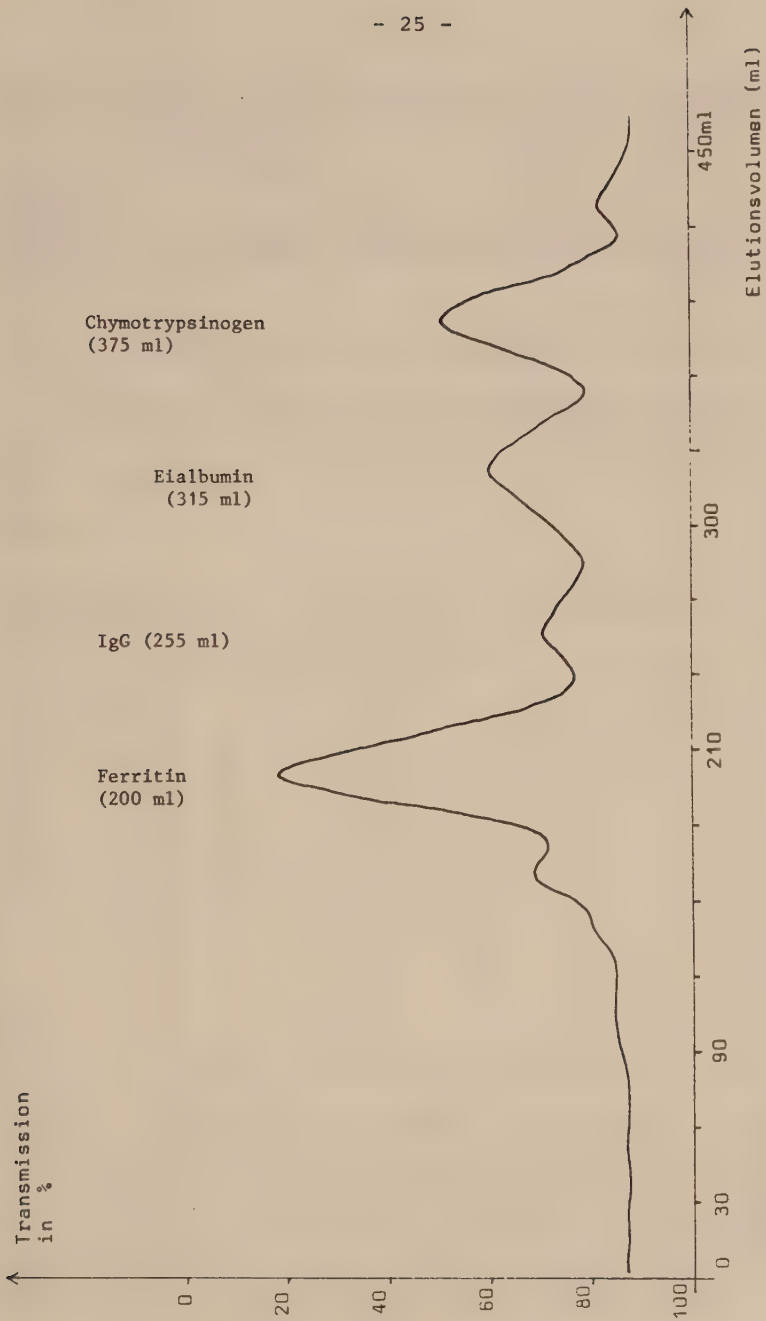


Abbildung 3 : Kalibrierung einer Ultrogel AcA 34 Säule mit Eichproteinen.

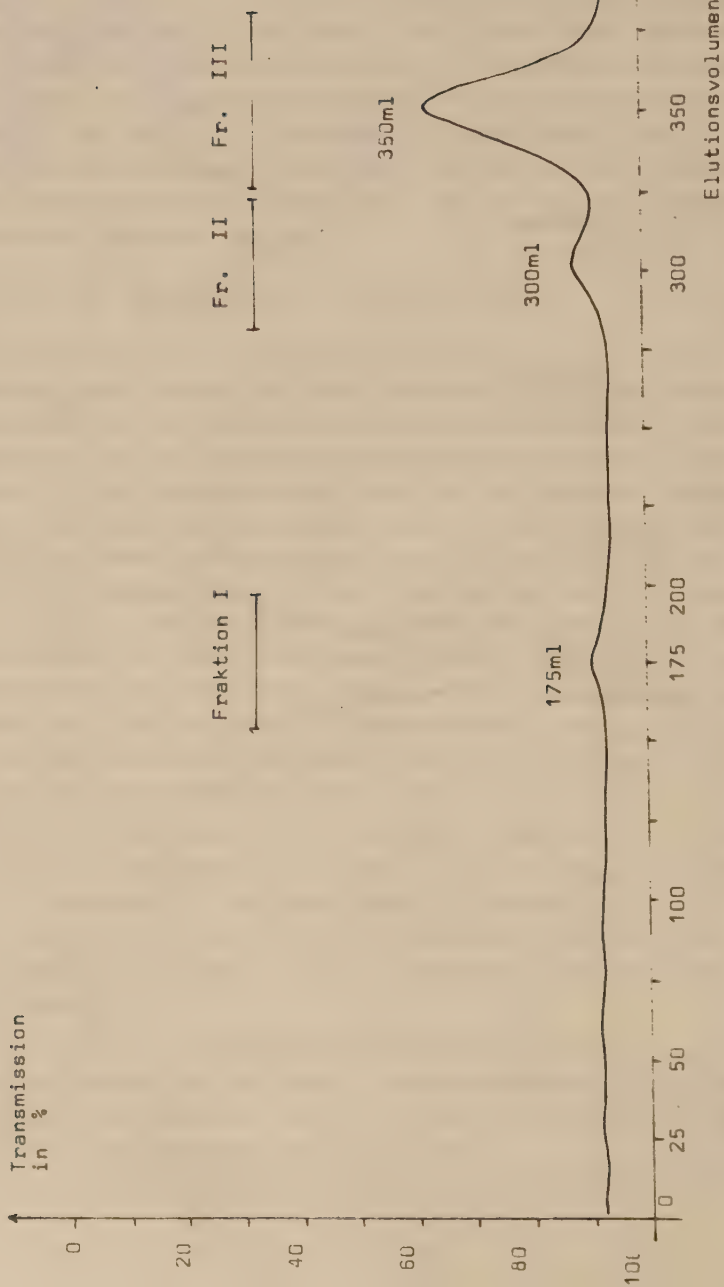


Abbildung 4 : Gelfiltration von Glutaraldehyd-vernetztem Eialbumin (molares Verhältnis 1:30)
an Ultrogel AcA 34.

3.1.2.3 Hauptversuch zur Herstellung von Staphylokokken-Enterotoxin B-Oligomeren durch Vernetzung mit Glutaraldehyd

In Analogie zu dem Modellversuch mit EA wurde anschließend SEB mit GluA durch Änderung des molaren Verhältnisses von SEB : GluA vernetzt.

3.1.2.3.1 Variierung der molaren Verhältnisse von SEB : GluA

Aus ökonomischen Gründen wurden pro Versuchsansatz jeweils 5 mg SEB in 3 ml PBS gelöst und mit einem molaren Überschuß an GluA vernetzt (Tab. 1).

Tabelle 1

Molares Verhältnis SEB : GluA	Zugabe von GluA (ml) pro 5 mg SEB	GluA-Lösung %
1 : 90	1,44	0,1
1 : 80	1,28	
1 : 70	1,12	
1 : 60	0,96	
1 : 50	0,80	
1 : 40	0,64	
1 : 30	0,48	
1 : 10	0,16	
1 : 1	0,16	0,01
1 : 0,5	0,8	0,001

Die Vernetzung und deren Unterbrechung durch Zusatz von Glycin sowie die Gewinnung der Vernetzungsüberstände erfolgten wie bereits in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben. Die Überstände wurden ausgiebig gegen TGP dialysiert und anschließend zentrifugiert. Danach wurde der Toxingehalt in den Überständen mit Hilfe der MANCINI-Technik bestimmt. Dabei lagen die Ausbeuten an

löslichen Poly- bzw. Oligomeren bei einem molaren SEB-GluA-Verhältnis von 1 : 30 bei 80 % der eingesetzten SEB-Menge.

Schließlich wurden die löslichen Vernetzungsprodukte von SEB in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im eindimensionalen Flachgel (SDS-PAA) analysiert.

Auf der Basis der SDS-PAA-Analyse und mit dem Ziel, SEB-Oligomere in präparativem Maßstab zu gewinnen, wurden nochmals 100 mg SEB mit einem 30fach molaren Überschuß von GluA vernetzt. Um die Bildung unlöslicher Polymere während des Vernetzungsvorganges zu vermeiden, wurden 100 mg SEB in 50 ml PBS gelöst und gegen Tris-NaCl-Puffer dialysiert.

3.1.2.3.2 Gelfiltration an Sephadex G 50

Zur Abtrennung von Monomeren wurde GluA-vernetztes SEB zunächst an Sephadex G 50 chromatographiert. Die Gelmatrix wurde in eine Säule (2,5 x 70 cm) gefüllt und gegen TGP äquilibriert. Die Bestimmung des Totvolumens und die Eichung der Säule erfolgten wie bereits beschrieben. Das vernetzte SEB wurde durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 5 ml eingeeengt und auf die Gelmatrix aufgetragen.

Nach der Auftrennung an Sephadex enthielt ein Teil der eluierten Fraktionen unlösliche Polymere, die durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Anschließend wurden die Überstände vereinigt und durch Ultrazentrifugation auf 5 ml konzentriert.

3.1.2.3.3 Gelfiltration an Ultrogel AcA 34

Die Auftrennung des auf 5 ml konzentrierten, an Sephadex G 50 chromatographierten Materials in Poly- bzw. Oligomere erfolgte an der bereits beschriebenen Ultrogel AcA 34-Säule (3.1.2.2.1, Abb. 3). Abbildung 5 zeigt ein repräsentatives Elutionsdiagramm von GluA vernetztem SEB (molares Verhältnis SEB : GluA = 1:30). Das eluierte Material wurde in fünf Fraktionen (Fr.I-V) vereinigt, eingeeengt, der Proteingehalt nach LOWRY bestimmt und anschließend in der SDS-PAA-Elektrophorese analysiert.

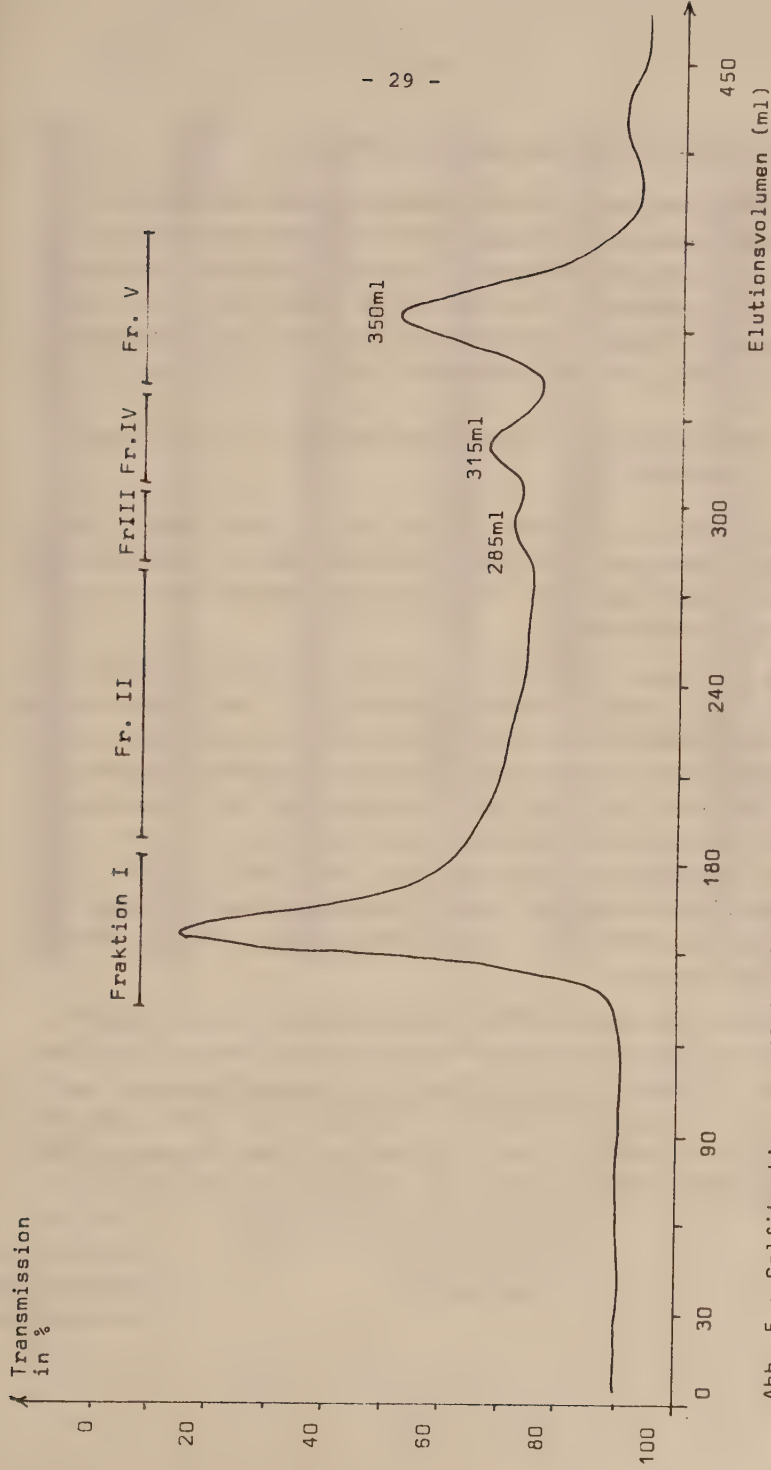


Abb. 5 : Gelfiltration von Glutaraldehyd-vernetztem SEB (molares Verhältnis 1:30)
an Ultrogel AcA 34

3.1.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach dem Verfahren nach DAVIES und STARK (1970) in Gegenwart von 10 % Na-dodecylsulfat durchgeführt, zusätzlich erfolgten Probeläufe mit 1 % Na-dodecylsulfat bzw. 1 % Na-dodecylsulfat mit anschließender 15minütiger Erwärmung auf 60°C. Als Bezugsgröße dienten Eichkits der Fa. Pharmacia (siehe 3.1.1) (Abb. 6).

3.1.2.4 Vorversuch zur Vernetzung von SEB mit Dimethylsuberimidate (DS)

Nachdem SEGAL et al. (1977) zeigen konnten, daß sich DS in besonderem Maße zur Vernetzung von Proteinen zu löslichen Oligomeren eignet, wurde DS im folgenden alternativ als Vernetzungsreagenz eingesetzt.

116 mg SEB wurden in 4,3 ml (27 mg/ml) 0,2 m Tris-HCl, pH 8,5 gelöst, DS in 30fach molarem Überschuß (14,7 mg) zugesetzt und der Reaktionsansatz für zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Vernetzungsprodukt an einer Sephadex G75-Säule getrennt, die zuvor mit Eichproteinen (EA, Chymotrypsinogen A und Cytochrom C) kalibriert worden war (Abb. 7). Das Elutionsdiagramm wies drei Peaks auf (Fr. I-III, Abb.8), deren Fraktionen vereinigt, durch Ultrafiltration eingeengt und mit Hilfe der MANCINI- und LOWRY-Methode sowie in der SDS-PAGE analysiert wurden.

Angesichts der ungenügenden Trenneigenschaften von Sephadex G 75 wurden die erhaltenen Fraktionen wieder vereinigt und über die AcA 34-Säule (3.1.2.2.1) filtriert. Daraufhin wurde jede einzelne, individuelle Fraktion innerhalb der Peaks wiederum mit Hilfe der MANCINI- und LOWRY-Methode sowie in der SDS-PAGE analysiert.



Abb. 6: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

a) Eichproteine

1. Thyroglobulin (330 000), 2. Ferritin (Half Unit-
220 000), 3. bovines Serum Albumin (67 000), 4. Catalase
(60 000), 5. Lactat Dehydrogenase (36 000)

b) Fraktion I

e) Fraktion IV

c) Fraktion II

f) Fraktion V

d) Fraktion III

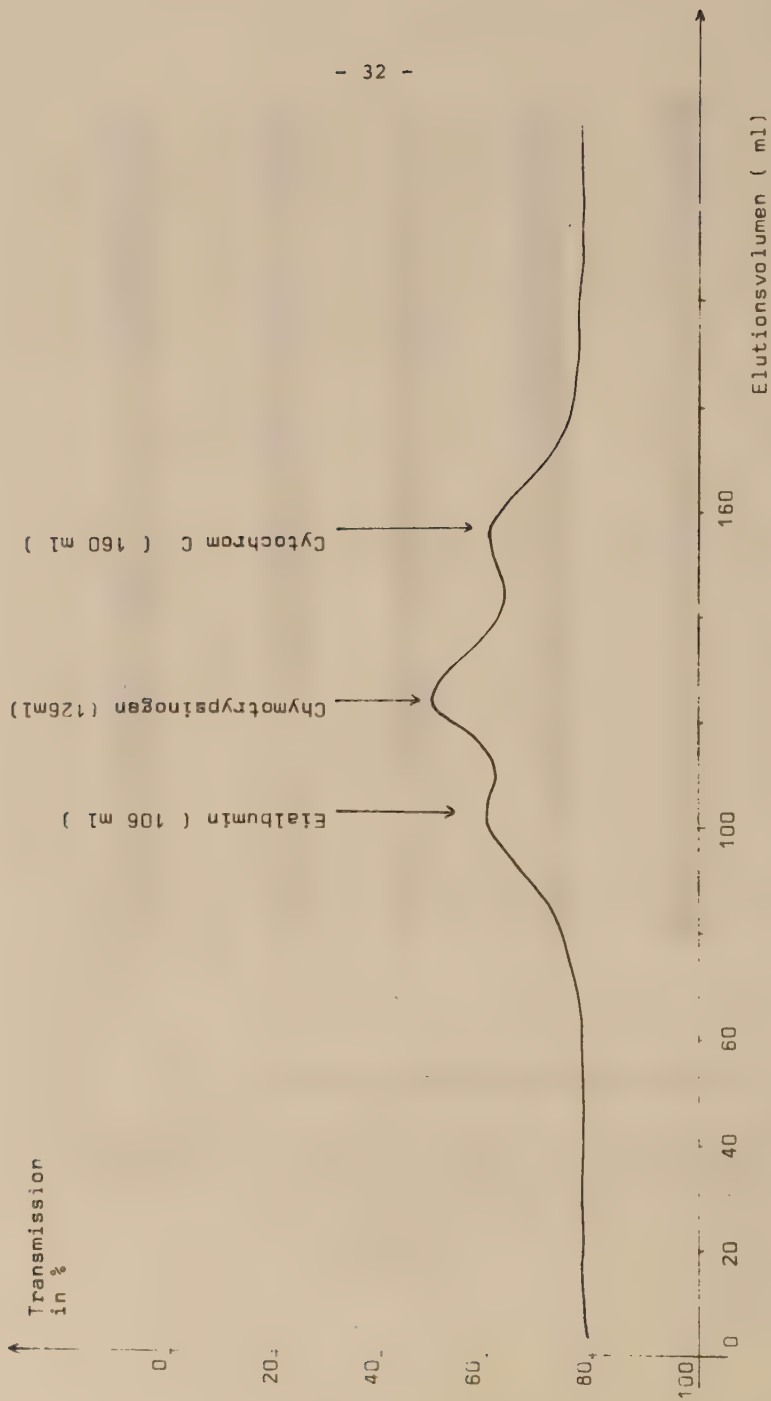


Abb 7 : Kalibrierung einer Sephadex G-75 Säule mit Eichproteinen.

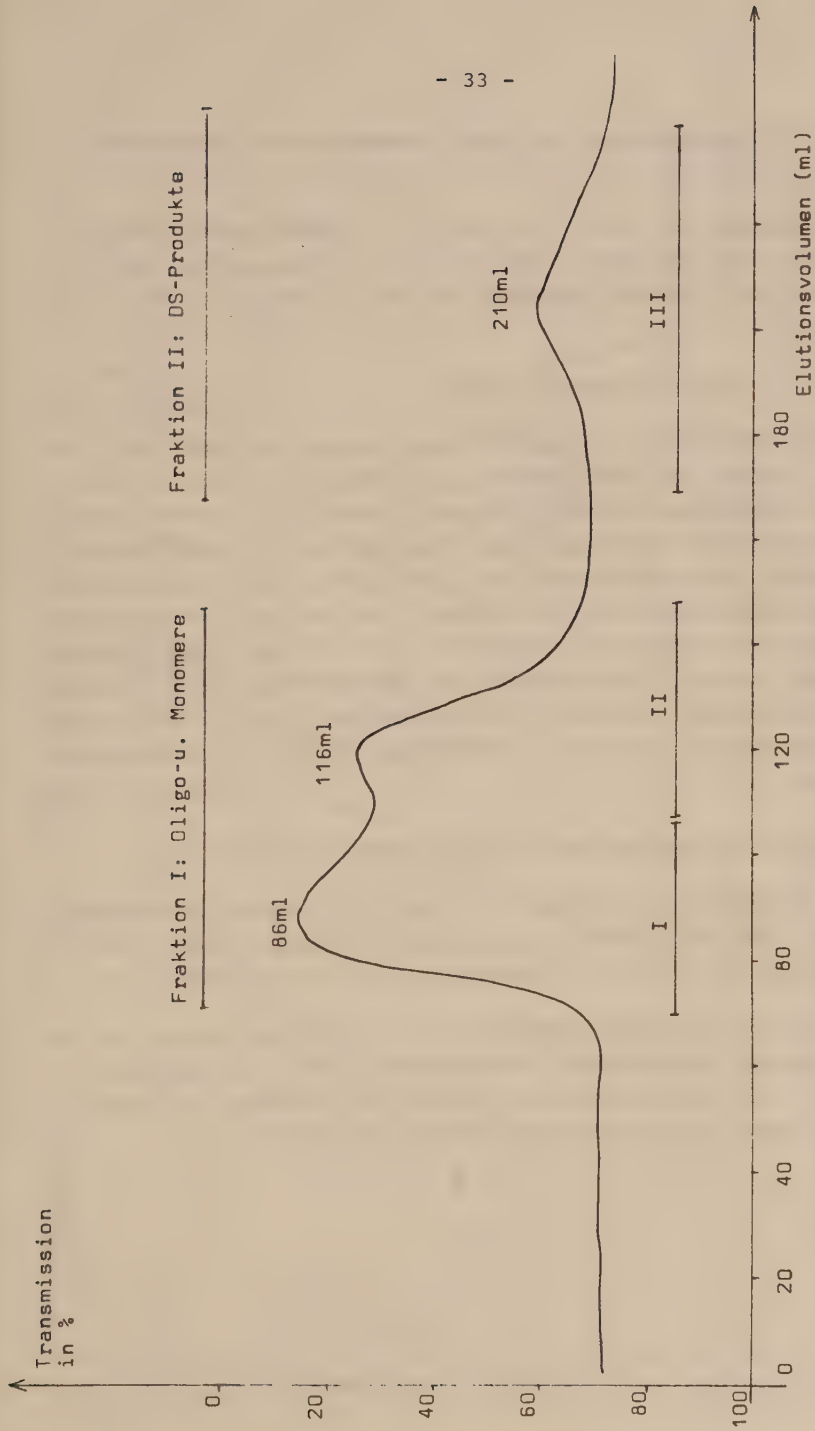


Abb. 8 : Gelfiltration von SEB nach Vernetzung mit Dimethyl-
suberimidate-dihydrochloride an Sephadex G-75

3.1.2.5 Herstellung von SEB-Oligomeren durch Vernetzung mit DS

In Anlehnung an die in Kapitel 3.1.2.4 beschriebenen Vorversuche wurden nun 250 mg SEB in 7,9 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 gelöst, 62,5 mg DS zugesetzt und zwei Stunden bei 30°C inkubiert.

3.1.2.5.1 Gelfiltration an AcA 34

Zur Gelfiltration an Ultrogel AcA34 wurde die Säule (2,5 x 100) neu gepackt, mit Eichproteinen kalibriert (Ferritin, Rinder IgG, Eialbumin, Chymotrypsinogen A, Abb. 9) und anschließend DS-vernetztes SEB aufgetragen. Die Elution erfolgte absteigend mit Tris-gepufferter NaCl-Lösung durch Einschalten einer Vario-Perpex-Pumpe (LKB, München). Das in Abb. 10 wiedergegebene Elutionsdiagramm zeigt vier Peaks. An individuellen Fraktionen wurden Proteinbestimmungen durchgeführt und der Gehalt an Multimeren in der SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden die Fraktionen gemäß der enthaltenen Vernetzungsprodukte vereinigt.

3.1.2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach DAVIES und STARK (1970) wurde in Gegenwart von 1 % SDS durchgeführt. Als Referenzproteine dienten wiederum Eichkits der Fa. Pharmacia (siehe 3.1.1) (Abb. 11).

Für analytische Untersuchungen in der SDS-PAGE wurden die zu elektrophoresisierenden Fraktionenpools 15 min bei 60°C erhitzt. Die Referenzproteine wurden nach Angaben des Herstellers zusätzlich mit Mercaptoäthanol behandelt.

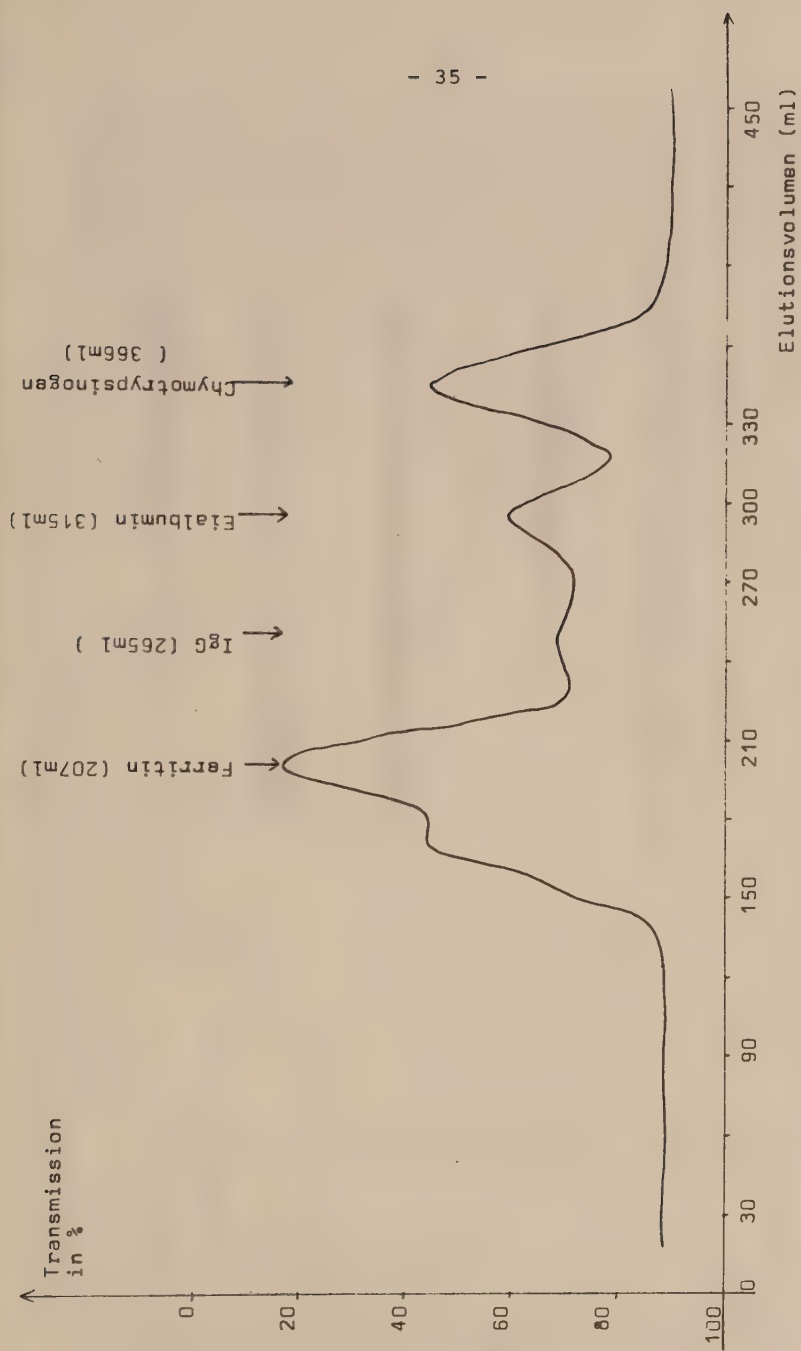


Abb. 9 : Kalibrierung einer Ultrogel AcA 34 Säule mit Eichproteinen.

Fractionen

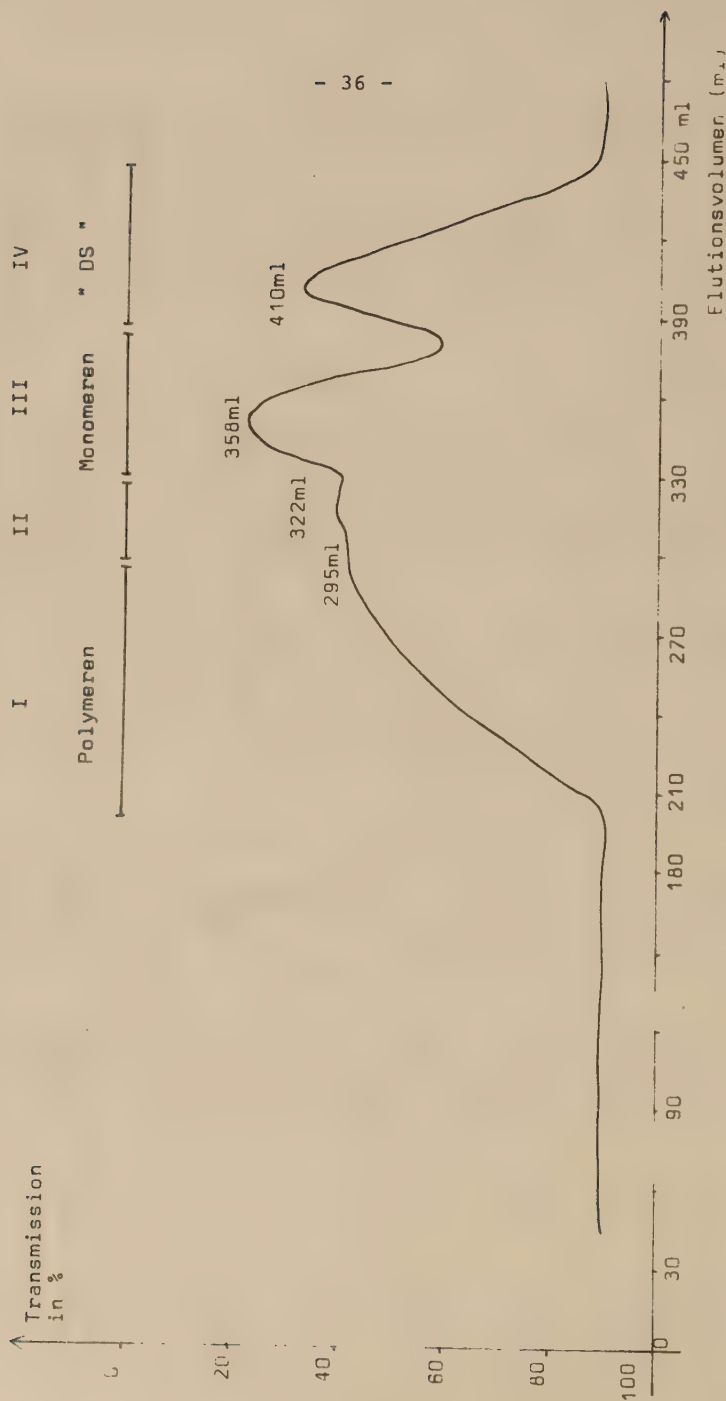
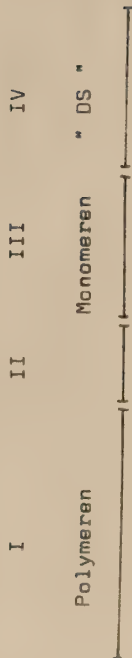


Abbildung 10 : Gelfiltration von DS-vernetztem SEB an Ultrogel Aca 34
(molares Verhältnis 1:30)

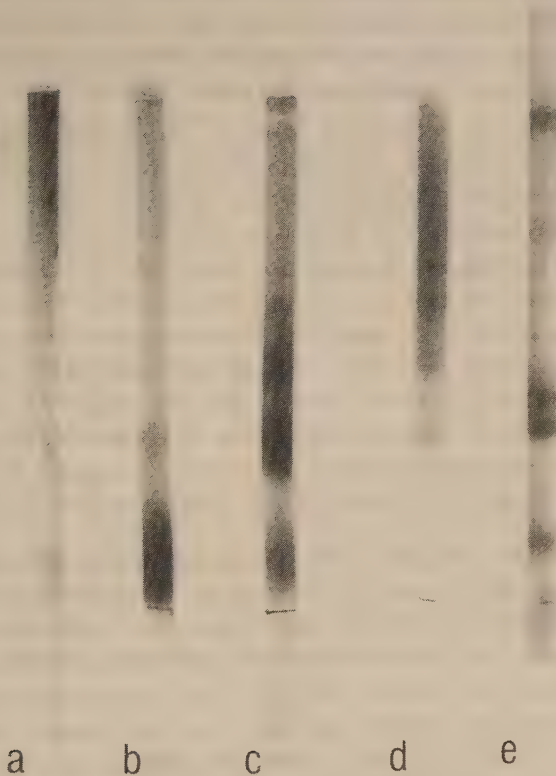


Abb. 11: Analyse von SEB Multi- und Monomeren nach Gelfiltration an AcA 34 in der SDS-PAGE

- a) Fraktion IV
- b) Fraktion III (Monomere)
- c) Fraktion II (Di- und Trimere)
- d) Fraktion I (Oligomere)
- e) Referenzproteine aufsteigend: Ferritin (Subunit 18 500), Lactat Dehydrogenase (36 000), Katalase (60 000), bovines Serum Albumin (67 000), Ferritin (Halbmolekül 220 000), Thyroglobulin (330 000).

3.2 Ergebnisse

Im Überstand des Vernetzungsansatzes des mit Glutaraldehyd (GluA) in einem molaren Verhältnis von 100 : 1 (GluA : SEB) vernetzten SEB ließen sich nur Spuren von Protein nachweisen, was dafür sprach, daß diese Art der Vernetzung nahezu vollständig zur Bildung unlöslicher Polymere führte.

Durch Verwendung von Eialbumin (EA) als zu vernetzendes Protein, wobei mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen die Bildung löslicher Vernetzungsprodukte getestet wurde, konnte die Vernetzung zunächst im Modell durchgeführt und damit erhebliche Kosten gespart werden. Die beste Auftrennung wurde bei einem molaren Verhältnis von 1 : 30 (EA : SEB) erreicht. Durch Vergleich der drei nach der Elution vereinigten Fraktionen mit Referenzproteinen konnten der Fraktion I Polymere, der Fraktion II Di- und Trimere und der Hauptfraktion III Monomere zugeordnet werden (Abb. 3 und 4). Außerdem konnten, gemessen am Proteingehalt der eluierten Fraktionen, 80 % der eingesetzten Menge an vernetztem EA wiedergefunden werden.

Mit diesen Ergebnissen waren die Voraussetzungen zur erneuten Vernetzung von SEB in geringen Mengen mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen gegeben. Bei einem GluA : SEB-Verhältnis von 1 : 0,5 bzw. 1 : 1 kam es nicht zur Vernetzung, während wenig dimeres Material und Spuren von tri- bzw. tetrameren Oligomeren bereits bei einem Verhältnis von 1 : 10 auftraten. Die Konzentration an Dimeren, Trimeren und Tetrameren verstärkten sich bei einem GluA:SEB-Verhältnis von 1:30, zusätzlich zeigten sich schwache Konzentrationen von Pentameren und Polymeren. Ähnliches wurde bei Konzentrationsverhältnissen zwischen 1 : 40 und 1 : 90 festgestellt. Die Ausbeuten an löslichen Oligomeren lagen bei einem SEB : GluA-Verhältnis von 1 : 30 bei 80 % der eingesetzten SEB-Menge.

Im Hinblick auf die Herstellung von SEB-Oligomeren für spätere Immunisierungsversuche wurde die Vernetzung anhand der beschriebenen Ergebnisse im folgenden mit einem Verhältnis

von 1 : 30 durchgeführt und eine größere Menge an SEB (100 mg) eingesetzt. Zur Abtrennung des monomeren Anteils wurde eine Gelfiltration an Sephadex G 50 vorgeschaltet. Die nach der Auftrennung in einem Teil der eluierten Fraktionen aufgetretenen unlöslichen Polymere mußten abzentrifugiert werden, was zu erheblichen Toxinverlusten in den verbleibenden Überständen führte. Die Gesamtausbeute belief sich auf nur 30 % (30 mg) des ursprünglich eingesetzten SEB. Die anschließende Gelfiltration an Ultragel ACA 34 führte zu geringeren weiteren Toxineinbußen. Von 30 mg SEB wurden 25,3 mg wiedergefunden, die sich auf die gepoolten Fraktionen I-V (Abb.5) wie folgt verteilten:

Fraktion I.	6 mg
Fraktion II:	4,5 mg
Fraktion III:	3,4 mg
Fraktion IV:	2,7 mg
Fraktion V:	8,7 mg

Die Analyse der fünf Fraktionen in der SDS-PAGE ist in Abb. 6 dargestellt. Fraktion I enthielt ausschließlich Polymere, Fraktion II wenig Dimere und hauptsächlich Tetramere sowie höhermolekulare Oligomere. Fraktion III wies neben Dimeren geringgradig monomeres Material auf, Fraktion IV ebenfalls Dimere und zunehmend monomere Anteile und Fraktion V fast nur Monomere.

Die Vernetzung von SEB mit Dimethylsuberimidate-dihydrochloride (DS) als einem weiteren Vernetzungsreagenz wurde zuerst im Vorversuch getestet. Das DS-vernetzte SEB sollte an Sephadex G75 getrennt werden. Die drei im Elutionsdiagramm auftretenden Peaks (Fraktion I-III, Abb.8) enthielten noch 50 % der eingesetzten SEB-Menge, bezogen auf den Proteingehalt. Die Analyse der Vernetzungsstufen erbrachte bei Fraktion I höhermolekulare Oligomere, Tri- und Dimere, Fraktion II wies lediglich monomeres SEB auf und Fraktion III enthielt kein Toxin mehr. Diese ungenügenden Trenneigenschaften bedingten eine Wiedervereinigung der Fraktionen und eine zusätzliche Filtration an Ultragel ACA 34. Hierbei traten keinerlei Verluste auf, bezo-

gen auf die eingesetzte Menge an vernetztem SEB wurden nahezu 100 % wiedergefunden. Die SDS-PAGE ergab eine Trennung in Oligomere verschiedener Größenordnung.

Die Ergebnisse des Vorversuches erlaubten die Produktion eines quantitativ und qualitativ für Immunisierungszwecke verwendbaren Antigens. Die Versuchsbedingungen zur Vernetzung wurden beibehalten, auf eine Gelfiltration an Sephadex G 75 wurde jedoch wegen Unrentabilität verzichtet. Die Auftrennung erfolgte sofort an Ultrogel AcA 34 (Abb. 10). Die an jeder Einzelfraktion durchgeführten Untersuchungen (Proteinbestimmung und Elektrophorese) ermöglichten eine Zusammenfassung der Einzelfraktionen in der Weise, daß jeder Fraktionenpool zu einem möglichst hohen Prozentsatz die gewünschte Vernetzungsstufe enthielt. Es wurden vier Fraktionen isoliert, wovon Fraktion I 51 mg, Fraktion II 67,6 mg und Fraktion III 63,6 mg Protein enthielten, was einer Wiedergewinnungsrate von 73 % entspricht. Abbildung 11 stellt die Ergebnisse der in der SDS-PAGE durchgeführten Analysen dar. Dabei enthielt Fraktion I Oligomere, Fraktion II hauptsächlich Di- und Trimere, kontaminiert mit monomerem SEB, Fraktion III Monomere und wenig dimeres SEB. Fraktion IV bestand zu geringem Teil aus gespaltenem Material, jedoch nicht aus intakten SEB-Molekülen.

Damit konnte bewiesen werden, daß es prinzipiell möglich ist, SEB mit DS zu Multimeren zu vernetzen und nach Gelfiltration an AcA 34 in Oligo-, Tri- und Dimere zu trennen. Auf dieser Basis konnten nun Multimere auf ihre immunogenen Eigenschaften untersucht werden.

3.3 Immunisierungsversuche

3.3.1 Material

Als Antigen diente das in 3.1.2.5 beschriebene, in eigener Produktion hergestellte DS-vernetzte und in Mono- Di- bzw. Tri- und Oligomere getrennte SEB.

Für die subcutane Applikation wurden zusätzlich Adjuvantien benötigt, wie Aluminiumhydroxid (Alugel), Fa. Serva, Heidelberg, und Freund'sches Komplex, bestehend aus 85 Volumenteilen Bayol F und 15 Volumenteilen Arlacel A, beides Fa. Serva, Heidelberg.

Als Versuchstiere standen Kaninchen "Deutsche Riesenhybriden" aus eigener Zucht der Laboratorien Dr.vet.med. Scheuber, Chirurgische Universitätsklinik München, Nußbaumstraße, ca. 2-3 Monate alt, mit einem Gewicht von 1,5 - 2 kg, weiblich und männlich zur Verfügung. Die Tiere wurden in Einzelkäfigbatterien, Modell Würzburg, Fa. Süße und Schmidt, gehalten, mit Altromin Alleinfutter (Pellets), Fa. Stettner München, und mit Wasser ad libitum versorgt. Zum Schutz vor Dekubitus wurden speziell angefertigte PVC-Platten (Herr Aschenbrenner, Institut für Lebensmittelhygiene, Universität München) nach Ablauf von zwei Monaten zusätzlich in die Käfige eingelegt.

Zur Vernebelung des Antigens wurde ein Inhalationsgerät der Fa. Pari, Starnberg, Typ Privat, verwendet, bestehend aus Kompressor und Vernebler (Abb.12). Das zu vernebelnde Material liegt in flüssiger Form vor und wird in den Medikamentenbecher eingefüllt. Aerosolisiert verläßt es die Verneblerkuppel, an deren Ansatzstück eine Gummimaske (Graf von Schlieffen, Hiddenhausen) angebracht worden war. Die Verbindung zwischen Kompressor und Vernebler wurde mit einem Druckschlauch hergestellt. Die vom Kompressor erzeugte Nebelleistung beträgt bis zu 161/min., bei einer Teilchengröße von 0,5-5,5 Mikron.

Zur Fixierung und Ruhigstellung der Tiere während des Inhalationsvorgangs wurde ein mit Deckel verschließbarer rechteckiger Kasten mit den Abmessungen 42 x 22 x 20 cm (Länge x Breite x Höhe) angefertigt, in den das jeweilige Tier gesetzt wurde (Herr Aschenbrenner, Institut für Lebensmittelhygiene, Universität München). Über eine ausgesparte Öffnung konnte der Kopf des Kaninchens so fixiert werden, daß er sich außerhalb des Kastens befand, so daß keine Möglichkeit bestand, ihn zurückzuziehen. Dieses System ermöglichte ein relativ ruhiges Einatmen des aerosolisierten Materials und eine problemlose Blutabnahme.

Abbildung 12: Aufbau eines PARI-Verneblers

Verneblerkuppel

Dichtung

Medikamentenbecher

Privat-Düse

Dichtung

Vernebler-Unterteil



Für die serologischen Testverfahren wurden zur Fällung des Serums Natriumsulfat, Fa. Merck Darmstadt, verwendet.

Des weiteren wurden benötigt: Standardisiertes Referenztoxin (SEB, SEA, SEC, SED, SEEC₂ und die entsprechenden Antiseren.

3.3.2 Methodik

3.3.2.1 Aerogene und parenterale Verabreichung von DS-vernetztem SEB

Zur Immunisierung standen 40 Kaninchen (Nr.1-40) zur Verfügung, wovon die Tiere Nr.37-40 als Kontrolle dienten. Verabreicht wurde monomeres, di- bzw. trimeres und oligomeres SEB. Pro Versuchsansatz wurden zwei Kaninchen eingesetzt und dem Schema entsprechend (Tab. 2) immunisiert.

Tabelle 2: Immunisierungsschema für Kaninchen

Präparat	Dosis (μg)	Immunisierung Tage		
		0	32	64
Monomeres SEB	40 200 1000	aerogen aerogen aerogen	aerogen aerogen aerogen	aerogen aerogen aerogen
Di- und Tri- meres SEB	dto.	aerogen	aerogen	aerogen
Oligomeres SEB	dto.	aerogen	aerogen	aerogen
Monomeres SEB	40 200 1000	aerogen aerogen aerogen	subcutan subcutan subcutan	subcutan subcutan subcutan
Di- und Tri- meres SEB	dto.	aerogen	subcutan	subcutan
Oligomeres SEB	dto.	aerogen	subcutan	subcutan

Vor Immunisierungsbeginn wurde den Tieren eine Anpassungszeit von vier Wochen gewährleistet, in denen sie per Trinkwasser mit Erythrocin-W^R und Noncoccin^R prophylaktisch versorgt wurden. Es war außerdem notwendig, Ohrenbehandlungen durchzuführen, da ein Großteil der Kaninchen kurz nach Anlieferung an Otitis parasitaria erkrankte. Zur Bekämpfung wurde eine Mischung aus Triplexan^R und Supracillin forte^R täglich in die Ohren geträufelt.

Als orientierende Maßnahme wurde ebenfalls vor Versuchsbeginn jedem Tier aus der Vena auricularis rostralis Blut entnommen und diese im modifizierten Ouchterlony-Test (MOT) (SOMMERFELD

und TERPLAN, 1975) auf etwaige Antikörper gegen Enterotoxine der Gattungen A, B, C, D und E untersucht.

Tier Nr.40 mußte wegen einer Nachhandlähmung eingeschlafert werden.

Aus technischen Gründen wurden die Immunisierungen in zwei Gruppen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt (Tab.3). Blutabnahmen fanden jeweils am 10., 20., 30., 40., 65., 72., 80., 85. und 90. Tag nach Versuchsbeginn statt.

Zur aerogenen Applikation wurde die gewünschte Konzentration an SEB-Lösung eingesetzt und jeweils auf 2ml aufgefüllt. Die Inhalation erfolgte mittels der am Vernebler angebrachten, eng auf die Nase des Kaninchens aufgesetzten Gummimaske und nahm 10-15 Minuten in Anspruch. Während dieser Manipulation saßen die Tiere ruhig in dem bereits beschriebenen Kasten, so daß eine zusätzliche medikamentelle Sedation sich als nicht notwendig erwies.

Die subcutane Immunisierung wurde mit Adjuvantien vorgenommen. Die SEB-haltige Lösung in der gewünschten Konzentration wurde an Aluminiumhydroxid im Verhältnis 1 : 1 adsorbiert, in komplettem Freund'schen Adjuvans inkorporiert und an mehreren Stellen subcutan appliziert.

Im Zeitraum zwischen 1. und 2. Immunisierung starben die Tiere Nr.2, 8, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 26 und 37 (Kontrolle) an einer kurzfristig auftretenden und innerhalb weniger Stunden zum Tode führenden Diarrhoe. Der pathologische Untersuchungsbefund aller Kaninchen ergab eine tiefgreifende, nekrotisierende Colitis, sowie Desquamativkatarrh der Lungen. Das Gutachten wies auf eine generalisierte Virusinfektion hin. Die Todesursache war nach Meinung der Pathologen nicht mit dem verabreichten Toxin in Verbindung zu bringen.

Nachdem alle im Versuch stehenden Tiere während der 1. Toxinapplikation aerogen immunisiert worden waren, bestand die Möglichkeit, einen Austausch innerhalb der Gruppen vorzunehmen, dessen Erfordernis sich aus den Todesfällen ergab (Tabelle 4).

Tabelle 3 : Immunisierungssplan für 39 Kaninchen vom Tag 0-90

1. Immunisierung Tag 0 Tag 1		1. Blut T 10 T 11		2. Blut T 20 T 21		3. Blut T 30 T 31		2. Immunisierung T 32 T 33		4. Blut T 40 T 41		3. Immunisierung T 64 T 65		5. Blut T 65 T 66		6. Blut T 72 T 73		7. Blut T 80 T 81		8. Blut T 85 T 86		9. Blut T 90 T 91	
Monomere: Tiere 1-6		1A 1A 5A 5A	2A 2A 6A 6A	1 1 3 3	2 2 4 4	1 1 3 3	2 2 4 4	1A 1A 5A 5A	2A 2A 6A 6A	1 1 3 3	2 2 4 4	1A 1A 5A 5A	2A 2A 6A 6A	1 1 3 3	2 2 4 4	1 1 3 3	2 2 4 4	1 1 3 3	2 2 4 4	1 1 3 3	2 2 4 4	1 1 3 3	2 2 4 4
Di-Trimere Tiere 7-12		7A 7A 9A 9A 11A	8A 8A 10A 10A 12A	7 7 9 9 11	8 8 10 10 12	7 7 9 9 11	8 8 10 10 12	7A 7A 9A 9A 11A	8A 8A 10A 10A 12A	7 7 9 9 11	8 8 10 10 12	7A 7A 9A 9A 11A	8A 8A 10A 10A 12A	7 7 9 9 11	8 8 10 10 12	7 7 9 9 11	8 8 10 10 12	7 7 9 9 11	8 8 10 10 12	7 7 9 9 11	8 8 10 10 12	7 7 9 9 11	8 8 10 10 12
Oligomere Tiere 13-18		13A 13A 15A 15A 17A	14A 14A 16A 16A 18A	13 13 15 15 17	14 14 16 16 18	13 13 15 15 17	14 14 16 16 18	13A 13A 15A 15A 17A	14A 14A 16A 16A 18A	13 13 15 15 17	14 14 16 16 18	13A 13A 15A 15A 17A	14A 14A 16A 16A 18A	13 13 15 15 17	14 14 16 16 18	13 13 15 15 17	14 14 16 16 18	13 13 15 15 17	14 14 16 16 18	13 13 15 15 17	14 14 16 16 18	13 13 15 15 17	14 14 16 16 18
Monomere Tiere 19-24		19A 19A 21A 21A 23A	20A 20A 22A 22A 24A	19 19 21 21 23	20 20 22 22 24	19 19 21 21 23	20 20 22 22 24	19A 19A 21A 21A 23A	20A 20A 22A 22A 24A	19 19 21 21 23	20 20 22 22 24	19A 19A 21A 21A 23A	20A 20A 22A 22A 24A	19 19 21 21 23	20 20 22 22 24	19 19 21 21 23	20 20 22 22 24	19 19 21 21 23	20 20 22 22 24	19 19 21 21 23	20 20 22 22 24	19 19 21 21 23	20 20 22 22 24
Di-Trimere Tiere 25-30		25A 25A 27A 27A 29A	26A 26A 28A 28A 30A	25 25 27 27 29	26 26 28 28 30	25 25 27 27 29	26 26 28 28 30	25A 25A 27A 27A 29A	26A 26A 28A 28A 30A	25 25 27 27 29	26 26 28 28 30	25A 25A 27A 27A 29A	26A 26A 28A 28A 30A	25 25 27 27 29	26 26 28 28 30	25 25 27 27 29	26 26 28 28 30	25 25 27 27 29	26 26 28 28 30	25 25 27 27 29	26 26 28 28 30	25 25 27 27 29	26 26 28 28 30
Oligomere Tiere 31-36		31A 31A 33A 33A 35A	32A 32A 34A 34A 36A	31 31 33 33 35	32 32 34 34 36	31 31 33 33 35	32 32 34 34 36	31A 31A 33A 33A 35A	32A 32A 34A 34A 36A	31 31 33 33 35	32 32 34 34 36	31A 31A 33A 33A 35A	32A 32A 34A 34A 36A	31 31 33 33 35	32 32 34 34 36	31 31 33 33 35	32 32 34 34 36	31 31 33 33 35	32 32 34 34 36	31 31 33 33 35	32 32 34 34 36	31 31 33 33 35	32 32 34 34 36
Kontrolltiere		37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39	37 37 39	38 38 39

Tabelle 4: Abgeändertes Immunisierungsschema nach erfolgter 1. Immunisierung

Antigen	2. Immunisierung		3. Immunisierung	
	Tag 32	Tag 33	Tag 62	Tag 63
Monomere:	1S 3A 5A	4A 6A	1S 3A 5A	4A 6A
Di- und Trimere:	7A 9A	10A 12A	7A	10A
Oligomere:	13A	14A 18A	13A	14A 18A
Monomere:	21S 23S	22S 24S	21S 23S	22S 24S
Di- und Trimere:	25S 27S 29S	28S 30S	25S 27S 29S	28S 30S
Oligomere:	31S 33A 35S	32S 34S 36S	31S 33A 35S	32S 34S 36S

Es sollte damit erreicht werden, daß pro Gruppe mindestens ein Tier zur Verfügung stand.

Nach der zweiten gemäß Tabelle 4 durchgeführten Immunisierung starben 2 Kaninchen (Nr.9 u.12) unter den gleichen Symptomen. Die Sektion durch das Institut für Tierpathologie erbrachte keine neuen Erkenntnisse.

Die dritte Toxinapplikation mußte an dem noch verbliebenen Tierbestand ohne Konstellationsänderungen innerhalb der Gruppen durchgeführt werden; es starben danach die Tiere Nr.1 und 4.

Nach der 9. Blutentnahme schloß sich eine Boosterung aller Tiere mit 1000 µg an mono-, di-, tri- bzw. oligomerem SEB an, wobei die für das jeweilige Tier bisher angewandte Applikationsart beibehalten wurde (Tab. 5).

Tabelle 5: Boosterung von mit DS-vernetztem SEB immunisierten Kaninchen

Tier Nr.	Dosis (µg)	Material (SEB)	Applikations- art
3	1000	Monomere	aerogen
5	1000	Monomere	aerogen
6	1000	Monomere	aerogen
7	1000	Di- und Trimere	aerogen
10	1000	Di- und Trimere	aerogen
13	1000	Oligomere	aerogen
14	1000	Oligomere	aerogen
18	1000	Oligomere	aerogen
21	1000	Monomere	subcutan
22	1000	Monomere	subcutan
23	1000	Monomere	subcutan
24	1000	Monomere	subcutan
25	1000	Di- und Trimere	subcutan
27	1000	Di- und Trimere	subcutan
28	1000	Di- und Trimere	subcutan
29	1000	Di- und Trimere	subcutan
30	1000	Di- und Trimere	subcutan
31	1000	Oligomere	subcutan
32	1000	Oligomere	subcutan
33	1000	Oligomere	aerogen
34	1000	Oligomere	subcutan
35	1000	Oligomere	subcutan
36	1000	Oligomere	subcutan

Die letzte und damit insgesamt 10. Blutentnahme erfolgte 18 Tage nach der Boosterung.

3.3.2.2 Serologische Untersuchungen

Zur Untersuchung auf Antikörperbildung wurde während der gesamten Immunisierungsperiode 10 mal Blut an der Arteria auricularis medialis abgenommen.

Das Blut wurde für 2 Stunden bei 37°C in den Brutschrank verbracht und anschließend 20 Minuten lang bei 3000 U/min. zentrifugiert. Das abgetrennte Serum wurde dekantiert und bis zur weiteren Verarbeitung über Nacht bei +4° - 8°C gelagert.

Zur Darstellung serologisch aktiver Globuline wurde die Natrium-Sulfat-Präzipitation als Schnellmethode angewandt. Zu diesem Zweck wurde zu Anti-SEB-Antiserum bei ständigem Rühren tropfenweise Na_2SO_4 -Lösung bis zu einer Endkonzentration von 18 % zugesetzt. Der Ansatz wurde für drei Stunden bei Zimmertemperatur belassen und das sich bildende Präzipitat für 20 Minuten bei 2000 xG zentrifugiert. Danach wurde das Präzipitat mit 18%iger Na_2SO_4 -Lösung gewaschen und schließlich in Aqua dest. und Phosphat-gepufferter NaCl (2:1, v/v) im originalen Serumvolumen gelöst. Auf eine weitere Reinigung der Ig-Rohfraktion bei 12%iger Na_2SO_4 -Konzentration wurde verzichtet.

Das auf diese Weise aufbereitete Serum konnte anschließend mit Hilfe der Ouchterlony-Technik qualitativ auf das Vorhandensein präzipitierender Antikörper untersucht werden.

3.4 Ergebnisse

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse aller 10 Blutentnahmen (1. - 3. vor der Boosterung, 10. nach der Boosterung) bezüglich Antikörperbildung dargestellt.

Während der gesamten Immunisierungsperioden traten nach aero-gener Applikation keinerlei Krankheitssymptome auf. Die subcutane Applikation führte zu starken Impfreaktionen in Form eitriger Abszesse an den Injektionsstellen, die zum Teil operativ entfernt werden mußten.

[illegible]

20 Tage nach der 1. Immunisierung, die in allen Fällen aerogen durchgeführt wurde (Tab.2), konnte noch keine Antikörperbildung nachgewiesen werden. Erst nach der 3. Blutabnahme erreichten 2/3 der Tiere Titer, Tier 33 sogar einen Titer von 1:8 - 1:16. Die 4. Blutabnahme erfolgte etwa 8 Tage nach der 2. Immunisierung, die auf zwei verschiedene Arten, sowohl aerogen als auch subcutan, vollzogen wurde (Tab.2). Größere Differenzen in der Antikörperbildung bestanden bei aerogener Applikation lediglich bei Tier 13, mit einem Titeranstieg von 1:4 - 1:16, das subcutan immunisierte Tier 28 erreichte nach einem anfänglichen Titer von 1:1 einen von 1:8 und Tier 29, ebenfalls nach subcutaner Toxinverabreichung, 1:16 (vorher 1:2). Die 5. Blutabnahme fiel zeitlich ungefähr mit der 3. Immunisierung zusammen, so daß die Ergebnisse sich noch auf die 2. Immunisierung bezogen. Bemerkenswert waren starke Titeranstiege sowohl innerhalb der aerogenen Gruppen (Tier 4, 10, 14, Tab.6), als auch bei den subcutan immunisierten Tieren (Tier 24, 30, 34, 35, 36, Tab.6). Kaninchen Nr.13, 28 und 29 konnten ebenfalls die Antikörperbildung nachweislich steigern. Die 6. Blutabnahme, die 7 Tage nach der 3. Immunisierung erfolgte, erbrachte einen totalen Titerabfall bei den aerogen Immunisierten. Diese Erscheinung änderte sich bis zur 9. Blutabnahme nicht. Im Gegensatz dazu waren bei den subcutan Immunisierten bis zur 9. Blutabnahme keine wesentlichen Veränderungen zu verzeichnen. Auch nach dem Boostern war es mit Ausnahme von Tier 33 (1:8) nicht mehr möglich, eine Steigerung des Antikörpertiters innerhalb der aerogenen Gruppen nachzuweisen. Dagegen konnte bei den subcutan immunisierten Tieren zumindest ein gleichbleibender, in den meisten Fällen ein erhöhter Titer festgestellt werden.

Nachdem 36 % der Tiere gestorben waren, läßt sich keine umfassende Aussage hinsichtlich der antigenen Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Molekülgröße treffen. Nach Abschluß der Untersuchungen war der Gehalt an durch Monomere induzierten Antikörpern niedriger als der durch di-, tri- bzw. oligomeres Material hervorgerufene. Die zwischenzeitlich hohen, mittels

aerogener Applikation erreichten Titer konnten ebenfalls durch di- bzw. tri- und oligomeres SEB induziert werden (Tier 10, 13, 14, Tab. 3 und 6), während die Verabreichung von Monomeren bei aerogener Immunisierung nur zu einem maximalen Titeranstieg von 1:8 - 1:16 (Tier 4, Tab. 6) führte. Die subcutane Applikation erbrachte bei allen drei Vernetzungsprodukten steigende Titer, bei Anwendung von Monomeren jedoch mit zeitlicher Verzögerung.

Auf eine Fortsetzung der Immunisierungsversuche zu erweitern den Studien mußte aufgrund eines im gesamten noch verbliebenen Tierbestand auftretenden Schnupfens verzichtet werden.

3.5 Herstellung der IgG - Rohfraktion aus Anti-SEB-Antiserum

3.5.1 Material

Zum Entbluten der Tiere wurden Rinderkanülen der Fa. Hauptner, München, verwendet.

Die Fällung der Seren erfolgte mit Ammoniumsulfat, Fa. Merck, Darmstadt.

Außerdem wurden, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, standardisierte Referenztoxine der Klassen A, B, C, D und E_{C2}, Firma Serva, und zusätzlich SEB-Referenztoxine in Form von Mono-, Di- und Tri- bzw. Oligomeren aus eigener Produktion angewendet. Analog dazu wurden standardisierte Antiseren der Fa. Serva und SEB-Antiserum aus institutseigener Produktion eingesetzt.

3.5.2 Methodik

Zur Herstellung von Antiserum wurden die Tiere mit dem höchsten Antikörpertiter entblutet und die Seren entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit zusammengefaßt (Tab. 7).

Die Kaninchen wurden in Rückenlage fixiert und mittels einer Rinderkanüle intracardial entblutet. Über einen an der Kanüle befestigten Schlauch floß das Blut in den Auffangbehälter und wurde gemäß der Gruppenzugehörigkeit gesammelt. Tier Nr. 27 kollabierte während des Entblutungsvorganges.

Tabelle 7: Überblick über die entbluteten Kaninchen

Tier Nr.	Applika- tionsart	Vernetzungs- produkt	Dosis (μ g)	Titer
21	subcutan	Monomere	200	1:16
22	"	"	200	1:32
23	"	"	1000	1:64
24	"	"	1000	1:32
25	subcutan	Di- und Trimere	40	1:32
27	"	"	200	1:32-64
28	"	"	200	1:32-64
29	"	"	1000	1:128
30	"	"	1000	1:64
31	subcutan	Oligomere	40	1:64
32	"	"	40	1:64
34	"	"	200	1:64
35	"	"	1000	1:64
36	"	"	1000	1:32-64
33	aerogen	Oligomere	200	1:8

Das Blut wurde 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank gehalten, anschließend der Blutkuchen gelöst und eine 20minütige Zentrifugation bei 3000 U/min. angeschlossen. Das abgesetzte Serum wurde ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Zur Fällung der Gammaglobuline, die nach Angaben von FEY erfolgte, mußten die Seren auf einen Proteingehalt (bestimmt nach LOWRY) von 3-4 % verdünnt werden. Das Serum wurde mit fast gesättigter, mit Ammoniak auf pH 7,0 eingestellter, 4 M Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis 1:1 über Scheidetrichter unter langsamem Rühren gefällt und anschließend 30 Minuten ebenfalls unter Rühren im Eisbad gehalten. Eine 20minütige Zentrifugation bei 25000 U/min und 4°C schloß sich an. Der

in wenig PBS aufgenommene Bodensatz wurde einer erneuten Fällung unter gleichen Bedingungen unterzogen. Das Zentrifugat wurde maximal bis zur Ausgangsmenge des Serums mit PBS gelöst und gegen PBS so lange dialysiert, bis das Außendialysat frei war von SO_4^{-2} Ionen. Der Sulfatnachweis erfolgte an kleinem Volumen nach vorheriger Ansäuerung mit HCl mittels 1%iger Bariumchloridlösung.

Die Seren wurden anschließend an Membranfiltern der Firma Schleicher und Schüll ($0,2 \mu\text{m}$ und $0,8 \mu\text{m}$) sterilfiltriert und mittels Ouchterlony-Technik auf Antikörperaktivität untersucht. Die ausgetesteten Seren wurden à 2 ml in Injektionsflaschen (Münnerstädter Glaswarenfabrik) portioniert, eingefroren und lyophilisiert. Nach der Lyophilisation erfolgte ein erneutes Austesten mittels Ouchterlony-Test gegen SEB der Firma Serva, gegen SEB-Mono-, Di- und Tri- bzw. Oligomere analog dem zu untersuchenden Serum und gegen Enterotoxine der Klassen A, C, D und E (Fa. Serva, Heidelberg).

3.6 Ergebnisse

In Tab. 8 und 9 sind die mittels Ouchterlony-Test ermittelten Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnisse vor der Lyophilisation

Antiserum	Referenztoxin	Titer
Monomeres SEB-Antiserum	Monomeres SEB	1:64
Di- und trimeres SEB-Antiserum	di- und trimeres SEB	1:128
Oligomeres SEB-Antiserum	oligomeres SEB	1:64-128
Antiserum von Tier 33	oligomeres SEB	1:4-8

Tabelle 9: Ergebnisse nach der Lyophilisation

Antiserum	Referenztoxin	Titer
Monomeres SEB-Antiserum	monomeres SEB	1:40
	SEB, Fa. Serva	1:40
Di- und trimeres SEB-Antiserum	di- und trimeres SEB	1:60
	SEB, Fa. Serva	1:40
Oligomeres SEB-Antiserum	oligomeres SEB	1:50
	SEB, Fa. Serva	1:30
Oligomeres SEB-Antiserum von Tier 33	Oligomeres SEB	1:5
	SEB, Fa. Serva	1:4

4. Diskussion

Die Möglichkeit, Proteintoxine durch Vernetzungsreaktionen unter Beibehaltung der immunogenen Wirksamkeit in ihrer Toxizität zu vermindern, sollte im Rahmen dieser Arbeit an SEB studiert werden. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob in der Immunogenität verschiedener Vernetzungsgrade Unterschiede bestehen. Dazu wurden die einzelnen über Säulenchromatographie getrennten Fraktionen mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden an Kaninchen verabreicht, wobei das Hauptgewicht auf der aerogenen Applikationsform lag.

Die aerogene Immunisierung weist einerseits einige Vorteile auf, hat andererseits den Nachteil, daß die inhalierten und retinierten Antigenmengen nicht erfaßt werden können und somit die zuverlässige quantitative Applikation nicht möglich ist. Bei Versuchen zur aerogenen Immunisierung in Aerosolkammern ist dieser Nachteil besonders ausgeprägt. Etwas vorteilhafter, auch wenn keine genaue Dosierung möglich ist, schien in dieser Hinsicht die individuelle Verabreichung über eine Maske zu sein. Bei diesem Verfahren zeigen sich deutliche individuelle Schwankungen in Atemfrequenz und Atemminutenvolumen der Tiere. Die angegebene Zeitspanne von 10-15 Minuten zur Inhalation der konstanten Menge von zwei Milliliter stellt einen Durchschnittswert dar. Die Fixierung der Kaninchen in dem beschriebenen Kasten verlief problemlos. Die Tiere verhielten sich absolut ruhig, so daß eine Lageveränderung der manuell an die Nase gepreßten Gummimaske nicht erfolgte. Allerdings läßt sich nicht ausschließen, daß ein Teil des Nebels an den Rändern entwich und eventuell conjunctival oder gar nicht aufgenommen wurde. Bei Form und Größe der Maske ragte nicht nur die Nase, sondern auch das Maul der Tiere in das Lumen der Maske; somit war auch eine orale Aufnahme möglich. Auch die Tatsache, daß dieses Verfahren bei 40 Kaninchen sehr zeitaufwendig war, wurde in Ermangelung einer anderen Methode in Kauf genommen.

Nachdem GluA als Vernetzungsreagenz in vielen Arbeiten als

besonders geeignet befunden wurde, wurde auch die Vernetzung von SEB zunächst mit diesem Reagenz versucht.

Ausgehend von der Versuchsanordnung nach PATTERSON et al. (1972) wurde SEB anfangs mit GluA in einem molaren Verhältnis von 1:100 vernetzt. Da das gewonnene Produkt nahezu ausschließlich aus unlöslichen Polymeren bestand, war es für eine spätere Aerosolisierung nicht geeignet. Aufgrund anschließender orientierender Untersuchungen mit Eialbumin (EA) sollte daher zunächst die Grundlage für die Vernetzung von SEB ermittelt werden. Bei einem molaren Verhältnis von 1:30 (EA : GluA) gelang es, ein Vernetzungsprodukt herzustellen, das in Fraktionen mit unterschiedlichen Molekulargewichten aufgetrennt werden konnte. Gleiche Ergebnisse wurden bei Verwendung von SEB erhalten. Unter sechs verschiedenen molaren Verhältnissen war auch hier 1:30 (SEB : GluA) vorzuziehen. Zwar konnten bei Relationen von 1:40 bzw. 1:90 ähnliche Vernetzungsstufen erzeugt werden, die Verluste lagen jedoch weitaus höher, da der Anteil an abzentrifugiertem hochpolymerem Material größer war. Das mit einem Verhältnis von 1:30 hergestellte Vernetzungsprodukt enthielt noch 80 % der ursprünglich eingesetzten Toxinmenge, die sich während der anschließenden Gelfiltrationen weiter verminderte. Nach Abschluß aller Versuchsschritte lagen zwar fünf Fraktionen unterschiedlicher Vernetzungsstufen vor, der hohe Gesamtverlust (unlösliche Polymere) führte jedoch zu einer ungünstigen Bewertung dieses Verfahrens.

Es wurden daher weitere Vernetzungsversuche mit Dimethylsuberimidate (DS) durchgeführt. Mit diesem Vernetzungsreagenz gelang es SEGAL et al. (1977), lösliche Oligomere zu erhalten und sie mit Hilfe der Säulenchromatographie in Untereinheiten aufzutrennen. Das molare Verhältnis betrug ebenfalls 1:30 (SEB : DS). Die Gelfiltration des Reaktionsproduktes an Sephadex G75 erwies sich als ungeeignet, da die Fraktionen der im Elutionsdiagramm erscheinenden Peaks (Abb. 6) ein Gemisch verschiedener Vernetzungsprodukte enthielten. Mit Ultrogel AcA 34 gelang es dann jedoch, eine Auftrennung in Oligomere verschie-

dener Größenordnung zu erreichen mit einer Wiedergewinnungsrate von 73%. Die erhaltenen Fraktionen wurden in drei zur Weiterverwendung geeignete Präparationen vereinigt, und zwar Monomere, zu einem Präparat zusammengefaßte Di- und Trimere sowie höhere Oligomere.

Die primäre Verabreichung der gewonnenen Antigene unterschiedlichen Vernetzungsgrades erfolgte in allen Fällen aerogen.

Die aerogene Applikation des Toxins verursachte keinerlei Krankheitssymptome und stand offensichtlich in keinem Zusammenhang mit den zahlreichen Todesfällen nach der ersten Immunisierung. Auch die Gruppenzugehörigkeit schien keine Rolle zu spielen, da sowohl die mit Mono-, Di- und Trimeren sowie Oligomeren behandelten Tiere nahezu gleichermaßen betroffen waren. Während in früheren Versuchen am Institut mit nativem SEB (HAMMER et al., 1979) die Kaninchen auch nach aerogener Applikation vor allem Nasenausfluß und Atmungsstörungen zeigten, wiesen die im Rahmen dieser Arbeit immunisierten Tiere nach Inhalation aller drei SEB-Präparationen keinerlei Krankheitssymptome auf. Die nach subcutaner Injektion lokal auftretenden eitrigen Abszesse waren höchstwahrscheinlich durch Adjuvantien bedingt. Systemische Krankheitserscheinungen zeigten sich auch in diesem Falle nicht. Insgesamt kann eine Verminderung der toxischen Wirkung des DS-vernetzten SEB angenommen werden, wobei offensichtlich keine Unterschiede hinsichtlich des Vernetzungsgrades bestehen. Es wäre von besonderem Interesse zu erfahren, ob DS-vernetztes SEB für Hund und Affen oral noch toxisch wirkt, was bei einer aerogenen Applikation bei diesen Säugern sehr wesentlich wäre.

Nach der ersten, ausschließlich aerogenen Immunisierung waren die ersten Antikörper mit dem höchsten Titer nach der dritten Blutabnahme (30. Tag) bei mit oligomerem Material behandelten Tieren zu ermitteln. Auf die zweite Immunisierung, die teils aerogen, teils subcutan durchgeführt wurde, folgten Titeranstiege in beiden Gruppen. Die größte Antikörperzunahme fand zwischen der vierten und fünften Blutabnahme (40. bzw. 64. Tag nach Immunisierungsbeginn) statt. Mit den aus Di- und

Trimeren zusammengesetzten und den aus Oligomeren bestehenden Antigenen konnten die höchsten Titer induziert werden. Bereits zu diesem Zeitpunkt waren die Titer der bei der zweiten Immunisierung subcutan behandelten Tiere höher. Die subcutane Verabreichung von 1000 µg Oligomeren rief den höchsten erreichten Wert von 1:64 bis 1:128 hervor.

Ab der 6. Blutabnahme (72. Tag nach Immunisierungsbeginn) traten plötzliche und größtenteils totale Titerabfälle bei allen aerogen immunisierten Kaninchen auf. Diese Beobachtung ist analog der systemischen Toleranz nach peroraler Immunisierung. Dabei sind die Mechanismen dieser Hemmung der systemischen Immunantwort in einer Suppression der T-Zellproliferation zu suchen, wobei T-Suppressorzellen operativ sind. Somit besteht experimentelle Evidenz für eine Koinzidenz von systemischer Toleranz und lokaler Immunantwort, deren Aktivität nach aerogener Applikation von SEB noch einer besonderen Prüfung bedarf. Bis zur 9. Blutabnahme blieben die Werte nahezu konstant und erfuhr auch nach der sich anschließenden Boosterung mit 1000 µg keine weitere Steigerung. Nur ein Tier (Nr.33) erreichte nach der Boosterung wieder einen Titer von 1:8.

Bei den subcutan immunisierten Kaninchen trat dieser eklatante Titerabfall nicht auf, die Werte blieben bis zur 9. Blutabnahme nahezu unverändert. Auffällig war, daß durch die 3. Immunisierung sowohl in der aerogenen als auch in den subcutanen Gruppen offenbar keine Immunantwort induziert wurde. Möglicherweise war der Organismus durch den bestehenden Schnupfen zu stark belastet.

Auch die Boosterung erbrachte nicht den erwarteten Erfolg. Die subcutan immunisierten Tiere steigerten zwar größtenteils ihren Antikörpergehalt, jedoch wurde nur in vier Fällen ein deutlicher Sprung verzeichnet.

Die abschließenden Untersuchungen an den Tieren mit den höchsten Titern aus jeder Gruppe zeigten, daß die Einzeltiter am

höchsten und häufigsten bei Verabreichung des oligomeren Materials erreicht wurden. Auch eine größere Zahl von Tieren, die mit dem aus Di- und Trimeren zusammengesetzten Antigen immunisiert worden waren, erreichte hohe Titerwerte. Eine Steigerung der Immunogenität durch vernetztes SEB ist somit erwiesen. Allerdings wären weitere Versuche in dieser Richtung wünschenswert.

In den nach der Entblutung gepoolten Antiseren läßt sich der deutliche Unterschied zwischen den Gruppen nicht mehr erkennen, was jedoch eine Folge der Aufarbeitung des Serums sein kann. PATTERSON et al. (1977) hatten bewiesen, daß künstlich hergestellte Vernetzungsprodukte auch mit IgG Gammaglobulin, die durch monomeres, also unpolymerisiertes Material induziert worden waren, reagieren. Dies war auch in eigenen Untersuchungen an den gereinigten Antiseren der Fall, wobei zwar nicht erhebliche, aber doch fast konstant höhere Titer gegen das homologe Antigen, verglichen mit dem nativen SEB (Referenzantigen, Fa. Serva) - sofern es die Gruppe der Di- und Trimere sowie der Oligomere betrifft - zu erzielen waren. Die Werte des monomeren Antiserums dagegen lagen sowohl gegen das homologe monomere SEB eigener Produktion, als auch gegen das native SEB der Fa. Serva auf dem gleichen Niveau.

Die Ergebnisse nach Inhalation des Antigens deuten eine Überlegenheit der subcutanen Verabreichung an. Berücksichtigt man, wie dies auch in der Literatur beschrieben wurde (DIRNAGL, 1973; LECLERQ, 1971; FOURNIER, 1975; SELIVANOV, 1975), daß nur ein geringer Anteil der ursprünglich eingesetzten Antigenmenge tatsächlich zur Wirkung kommt, so ist nicht auszuschließen, daß durch eine gleich große, aerogen verabreichte, jedoch in vollem Umfang effektive Dosis eine der subcutanen Applikation vergleichbare Antikörperproduktion induziert würde. Der Zusatz von Adjuvantien könnte ebenfalls zur Steigerung der Immunantwort beitragen.

Eine weitere Möglichkeit, das Immunisierungsverfahren zu verbessern, bestünde in einer primären subcutanen Applikation des

Antigens mit Aerosolrevakzination, wie YAMASHIRO et al. (1966) und BARTLEMA (1972) mit Tetanustoxoid zeigten.

5. Zusammenfassung

Um Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) im Hinblick auf die Immunisierung von Kaninchen bei unverminderter Antigenität zu detoxifizieren, wurde es mit Glutaraldehyd (GluA) sowie mit Dimethylsuberimidat (DS) vernetzt. Während GluA sich als weitgehend ungeeignet erwies, entstanden bei der Vernetzung mit DS in einem molaren Verhältnis von 1 : 30 verschiedene Polymerisationsgrade von SEB, die durch Gelfiltration an Ultrogel ACA 34 getrennt werden konnten.

Immunisierungsversuche an Kaninchen zeigten bessere immunogene Eigenschaften des vernetzten (Di- und Trimere als eine, sowie Oligomere als weitere Fraktion) gegenüber dem unpolymerisierten SEB. Die Toxizität des Antigens wurde durch den Vernetzungsvorgang zumindest deutlich eingeschränkt. Die Antikörper-Titer lagen nach subcutaner Applikation höher als nach aerogener. Durch vernetztes Material induzierte Antikörper wiesen gegenüber dem homologen Antigen, verglichen mit dem nativen unbehandelten SEB, eine stärkere Reaktionsfähigkeit auf.

Summary

With regard to immunization-experiments with rabbits, staphylococcal enterotoxin B (SEB) was cross-linked with glutaraldehyd (GluA) and dimethylsuberimidate (DS) to detoxificate SEB. The antigenic efficiency should be retained. GluA proved to be unsuitable while polymerizing of SEB with DS in a molar ratio of 1:30 to multimers and separation by chromatography on AcA 34 proved to be advantageous.

Immunization-experiments with rabbits demonstrated higher immunogenic activities of the polymerized toxin (one fraction: dimers and trimers, another fraction: oligomers) in contrast to unpolymerized SEB. In addition the antigen was detoxificated by cross-linking. The subcutaneous application provoked a better immunresponse than an inhalation of the aerosol. The polymerized material induced antibodies which showed a much more higher reactivity against the homologous antigen than against native, untreated SEB.

6. Literaturverzeichnis

ALEKSANDROV, N.I., N.E. GEFEN, N.B. EGOROVA, V.M. SEGEEV,
P.D. MATYUK und M.S. SMIRNOV (1960):

Aerosol immunization with dried atomized vaccine and toxoid.
Report II: A study on efficacy of aerosol immunization and
reimmunization with dried powdered diphtheria toxoid (russisch).
Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 31 (7), 92-107.

ANGELOTTI, R. (1969):

Staphylococcal intoxications. in: RIEMANN, H.:
Food-borne infections and intoxications, p. 359-393.
1. Aufl., Academic Press, New York und London.

ASQUITH, R.S., M.S. OTTERBURN und W.J. SINCLAIR (1974):

Die Quervernetzung über Isopeptidbindungen - ihr Vorkommen
und ihre Bedeutung beim Proteinaufbau.
Angew. Chemie 16, 580.

AVENA, R.M. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physicochemical properties of entero-
toxin C, Staphylococcus aureus strain 361.
Biochem. 6, 1474-1480.

AVRAMEAS, S. (1969):

Coupling of enzymes to proteins with Glutaraldehyd. Use of
the conjugates for the detection of antigens and antibodies.
Immunochem. 6, 43-52.

AVRAMEAS, S. (1972):

Enzym markers: their linkage with proteins and use in immuno-
histochemistry.
Histochem.J. 4, 321-330.

AVRAMEAS, S. und B. GUILBERT (1972):

Enzym-immunoassay for the measurement of antigens using
peroxidase conjugates.
Biochimie-Extrait du Tome 54, 837-842.

AVRAMEAS, S., B. TAUDOU und S. CHUILON (1969):

Glutaraldehyd, cyanuric chloride and tetraazotized o-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. *Immunochem.* 6, 67-76.

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1967):

Biologically active water-insoluble protein polymers.

1. Their use for isolation of antigens and antibodies.

J. of Biol. Chem. 242, 1651-1659.

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1969):

The cross-linking of proteins with Glutaraldehyd and its use for the preparation of immunoadsorbents.

Immunochem. 6, 53-66.

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1971):

Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration.

Immunochem. 8, 1175-1179.

BARTLEMA, H.C. (1966):

Discussion YAMASHIRO, H.N. et al., 1966.

Bact. Rev. 30, 633-635.

BARTLEMA, H.C., R. BRAUNIUS und L. HÖLSCHER (1972):

Studies on respiratory immunization with tetanus toxoid: the role of adjuvants.

J. Hyg. (Camb.) 70, 627-638.

BARTLEMA, H.C., W.L.J. HÖLSCHER und R. BRAUNIUS (1969):

Immunization of mice against tetanus by means of toxoid aerosols. The adjuvant effect of Bordetella pertussis preparations.

Med. Biol. Lab. Nation. Def. Res. Org. TNO MBL 1969-4.

BARTNINKAS, I.I. (1973):

Untersuchungen zur Immunogenese bei Gruppen von gegen Salmonellose und Rotlauf aerosol-immunisierten Ferkeln (russ.), p.227-232. In: *Immunitet sel'skochozajstvennych Zivotnych*, Moskau 1973,

BEARD, L.W. und B.L. EASTERDAY (1965):

An aerosol apparatus for the exposure of large and small animals: Description and operating characteristics.
Am. J. Vet. Res. 26, 174-182.

BERGDOLL, M.S. (1970):

Enterotoxins. In: MONTIE, I.C., S. KADIS und S.J. AJL (1970):
Microbial Toxins. Vol. III, p.265-362.
Academic Press, New York und London.

DERSELBE (1972):

The enterotoxins. In: COHEN, J.O. (1972): The Staphylococci,
p. 301-331.
Wiley-Interscience, New York, London, Sidney, Toronto.

DERSELBE (1980):

Persönliche Mitteilung.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.
J. Bact. 90, 1481-1485.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):

Identification of enterotoxin E.
Infect. Immun. 4, 593-595.

BERGDOLL, M.S. und R.N. ROBBINS (1973):

Characterization of types of staphylococcal enterotoxins.
J. Milk Food Technol. 36, 610-612.

BERGDOLL, M.S., M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1959):

Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property.
J. Immunol. 83, 334-338.

BOLOTOVSKIJ, M. (1959):

Die theoretischen Voraussetzungen für die Arbeit der Aerosolkammer IVK-1 beim Studium von experimentellen Infektionen der Atmungsorgane. Mitteilung 1: Der Arbeitsablauf in der Aerosolkammer (russ.).

D.I. Ivanovsky-Institut für Viruskunde Akad. der Med. Wiss.
der UdSSR, Moskau.

BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and partial characterization of enterotoxin C
produced by Staphylococcal aureus strain 137.

Biochem. 6, 1467-1473.

CAMPBELL, D.H., E. LUESCHER und L.S. LERMAN (1951):

Immunologic adsorbents. I. Isolation antibody by means of a
cellulose-protein antigen.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 37, 575-578.

CASMAN, E.P. (1960):

Further serological studies on staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 79, 849-856.

CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):

Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, ente-
rotoxin D.

J. Bact. 94, 1875-1882.

CATEIGNE, G. (1971):

Immunisation de la souris par inoculation, sous forme d'Aero-
sol, de virus grippal d'élipide.

Curr. Acad. Sci. Paris 272, 1822-1825.

CHALLACOMBE, S.J. und T.B. TOMAS (1980):

Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization.

J. Exp.Med. 152, 1459-1472.

COURTICE, F.C. und J.W. SIMMONDS (1950):

Proteinresorption by the lungs.

J. Physiol. 109, 75-81.

ref.: Dt.med.Wschr. 75, 95-109.

DANGERFIELD, H.G. (1973):

Effect of enterotoxins after ingestion by humans.

Vortrag, Annual Meeting American Soc. for Microbiology.

DAUGHARTY, H., J.E. HAPPER, A.B. MacDONALD und A. NISONOFF (1969):

Quantitative investigations of idiotypic antibodies.

I. Analysis of precipitating antibody populations.

Dep. of Microbiol. University of Illinois at the Medical Center, Chicago, Ill. 60680, 1047-1062.

DAVIES, G.E. und G.D. STARK (1970):

Use of Dimethylsuberimidate as cross-linking reagent. In: Studying the subunit structure of oligomeric proteins.

Proc. of the Nat. Academy of Sciences 66, 651-656.

DIMMICK, R.L. und A.B. AKERS (1969):

An introduction to experimental aerobiology.

Wiley-Interscience, A Division of John Wiley and Sons, New York 1969.

DIRNAGL, K. (1973):

Technik der Aerosolerzeugung und Anwendung.

Proceeding First Intern. Congr. on Aerosols in Medicine, Baden/Wien, 19.-21.9.1973, 57-63.

DRESSER, D.W. (1961):

Effectiveness of lipid and lipidophilic substances as adjuvants.

Nature 191, 1169-1171.

DRUETT, H.A. (1967):

The inhalation and retentation of particles in the human respiratory system. In: GREGORY, P.H. und J.L. MONTEITH (Ed.): Airborne Microbes, p. 165, Cambridge 1967.

DRUETT, H.A. und K.R. MAY (1952):

A wind tunnel for the study of airborne infections.

J. Hyg. (Camb.) 50, 69.

ENIGK, K. (1953):

Zur Behandlung des Lungenwurmbefalles der Wiederkäuer durch Aerosole.

Mh. Tierheilkd. 5, 14-22.

FASOLD, H., J. KLAPPENBERGER, C. MAYER und H. REINOLD (1971):

Bifunktionelle Reagentien zur Quervernetzung von Proteinen.

Angew. Chem. 22, 875-876.

FELDMANN, G., P. DRUETT, J. BIGNON und S. AVRAMEAS (1975):

Immunoenzymatic techniques.

Proceedings of the first international symposium on immuno-enzymatic techniques, Paris 1975.

North-Holland Publishing Company, Amsterdam-Oxford.

American Elsevier Publishing Company, Inc., New York.

FEWTRELL, C. und H. METZGER (1980):

Larger oligomers of IgE are more effective than dimers in stimulating rat basophilic leukemia cells.

J. of Immun. 125, 701-710.

FEY, H.:

Arbeitsanleitung zur Herstellung von Gammaglobulinen für die Fluoreszenztechnik.

Arbeitsblatt aus dem vet.-bakt. Institut der Universität Bern.

FONTANGES, R., W.R. BRUNAT und H. BESSON (1968):

L'immunisation par aérosols. I. Construction d'une nouvelle chambre d'expérience conditionnée.

Ann. Inst. Pasteur (Paris) 114, 608-623.

FONTANGES, R., J. CORDEL, B. IVANOFF, D. ROBERT und P.

ISOARD (1979):

Etude chez la souris Balb/c de l'efficacité de la voie aérosol comparativement à d'autres voies d'inoculation dans le cas d'un immunostimulant.

Poumon 35, 383-390.

FONTANGES, R., A. CORNET, W.R. BRUNAT, F. JAKOB, H. MONTEIL und S. FERRY (1970):

L'immunisation par aérosols. VI. Vaccination des singes babouins par l'anatoxine diphtérique lyophilisée.

Ann. Inst. Pasteur (Paris) 119, 172-192.

FONTANGES, R., J.M. FOURNIER, H. MONTEIL, P. DARMENTON und A. GAIRARD (1971):

L'immunisation par aérosols. VII. Vaccination des singes babouins par l'anatoxine tétanique lyophilisée et par le mélange a tétanique a diphtérique.

Ann. Inst. Pasteur (Paris) 120, 831-848.

FOURNIER, J.M. (1975):

L'immunisation collective par aérosols d'antigènes lyophilisés. Assoc. Amicale des Etudants en Pharmacie de Lyon, 1975.

GAPOTCHKOV, K.G. und W.I. OGARKOV (1972):

Experimentelle Nachbildung einer aerogenen Infektion (russ.). Zh. Microbiol. Epidem. Immunbiol. 11, 84-92.

GRÄNZER, W. (1968):

Aerosoltherapie beim Tier, Verabreichung von Gamma-Globulin beim Kalb.

Vet. Med. Diss., München 1968.

GRIFFITH, W.R. (1964):

A mobile laboratory unit for exposure of animals and human volunteers to bacterial and viral aerosols.

Am. Rev. Res. Dis. 89, 240-249.

HABEEB, A.F.S.A. (1967):

Preparation of enzymically active, water-insoluble derivatives of trypsin.

Arch. of Biochem. and Biophys. 119, 264-268.

HAMMER, D.K., J. MASCHESKY und G. TERPLAN (1979):

Unveröffentlichte Mitteilung.

HARSTAD, J.B., M.E. FILLER, W.T. HUSHEN und H.M. DECKER (1970):
Homogeneous bacterial aerosols produced with a spinning-disc
generator.

Appl. Microbiol. 20, 94-97.

HATCH, M.T. (1961):

Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract.

Bact. Rev. 25, 237-240.

HATCH, T.R. und P. GROSS (1964):

Pulmonary deposition and retention of inhaled aerosols.

Acad. Press, Inc. New York 1964.

HENDERSON, D.W. (1952):

An apparatus for the study of airborne infection.

J. Hyg. (Camb) 50, 53-68.

HUANG, J.Y. und M.S. BERGDOLL (1970).

The primary structure of staphylococcal enterotoxin B.

I. Isolation, composition and sequence of tryptic peptides from oxidized enterotoxin B.

J. Biol. Chem. 245, 3493-3510.

HUANG, J.Y., E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1975):

The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins.

Jap. J. Med. Sci. Biol. 28, 73-75.

JEMSKY, J.V. und G.B. PHILLIPS (1965):

Aerosol-challenge of animals.

In: Methods of animal experimentation, 1965.

KANTOR, P. (1965):

Untersuchungen über Verträglichkeit, Dosierung und Gewebskonzentration einiger Arzneimittel zur Aerosoltherapie bei Tieren.
Vet. Med. Diss., München 1965.

LECLERQ, P. (1971):

Etude chez la souris du pouvoir adjuvant d'une endotoxine bactérienne au cours de la vaccination par aérosols d'anatoxine tétanique lyophilisée.

Travail de la division de Microbiologie du centre de recherches du service de santé des armées, Lyon 1971.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

MANCINI, G., CARBONARA, A.O. (1965):
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochem. 2, 235-254.

MAYHEW, C.J. und N. HAHON (1970):
Assessment of aerosol mixtures of different viruses.
Appl. Microbiol. 20, 313-316.

METZGER, W.J., P. PATTERSON, C.R. ZEISS, J.S. IRONS, J.J. PRUZANDKY, I. SUSZKO und D. LEVITZ (1976):
Comparison of polymerized and unpolymerized antigen E for immunotherapy of ragweed allergy.
The New Engl. J. of Med. 295, 1160-1164.

MIDDLEBROOK, G. (1952):
An apparatus for the airborne infection of mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 80, 105-110.

MIDDLEBROOK, G. (1961):
Immunological aspects of airborne infection. Reactions to inhaled antigens.
Bact. Rev. 25, 331-346.

MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1976):
Staphylococci and their significance in foods.
Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York 1976.

MITCHELL, R.F. (1960):
Retention of aerosol particles in the respiratory tract, a review.
Am. Rev. Resp. Dis. 82, 627-639.

MÖHLMANN, H., P. STÖHR, V. SCHULZ und M. MICHAEL-MEESE (1972):
Zur Möglichkeit und zum Verlauf einer experimentellen aerogenen Rotlaufinfektion des Schweines.
Arch.exp. Vet. med. 26, 1-9.

MUROMTSEV, S.N., N.A. BORODYUK und V.P. NENASHEV (1960):
Experimental reimmunization with diptheria toxoid by inhalation (russ.).

Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 31 (5), 22-25.

MUROMTSEV, S.N., N.A. BORODYUK, V.P. NENASHEV und R.M. ALESHINA (1961):

Revaccination of children with diptheria toxoid by inhalation (russ.).
Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 32 (4), 6-10.

NIESSEN, H., H. TIETZ, G. HECHT und G. KIMMERLE (1963):
Über das Vorkommen von Sulfoniumverbindungen in Metasystox (I) und Metasystox (R) und ihre physiologische Wirkung.
Arch. Tox. 20, 44-60.

NÜCKEL, H. (1958):
Grundlagen der Aerosoltherapie.
Therapie der Gegenwart 97, 1-15.

PATTERSON, R., I.M. SUSZKO und F.Mc INTIRE (1973):
Polymerized ragweed antigen E.I. Preparation and immunologic studies.
J. of Immunol. 110, 1402-1412.

PATTERSON, R., I.M. SUSZKO, J.J. PRUZANSKY und C.R. ZEISS (1973):
Polymerized ragweed antigen E. II. In vivo elimination studies and reactivity with IgE antibody systems.
J. of Immunol. 110, 1413-1418.

PATTERSON, R. und I.M. SUSZKO (1974):
Polymerized ragweed antigen E. III. Differences in immune response to three molecular weight ranges of monomer and polymer.
J. of Immunol. 112, 1855-1860.

PATTERSON, R. und I.M. SUSZKO (1976):
Polymerized ragweed antigen E. IV. The analysis of the stability of molecular size and antigenic reactivity of the polymer.
J. Allergy Clin. Immunol. 57, 168-173.

PATTERSON, R., I.M. SUSZKO, J.J. PRUZENSKY, C.R. ZEISS,
W. METZGER und M. ROBERTS (1977):

Polymerization of mixtures of grass allergens.
J. Allergy Clin. Immun. 59, 314-319.

PETZOLDT, K., C. VON BENTEN und W. FLOER (1975):

Literaturstudie über "Einsatz und Grenzen der aerogenen Massenimmunisierung gegen bakterielle Infektionskrankheiten unter Feldverhältnissen.

Unveröffentlichte Mitteilung.

PICKROTH, G. (1963):

Ultraschall- und Düsen-aerosole in der Medizin.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963.

PRUDNIKOV, S.J. (1973):

Untersuchung der Immunitätsdauer bei Schweinen, die mit einem Aerosol der Rotlaufvaccine SSVR geimpft worden waren (russ.).
Sb.nauc. Rabot. 17, 139-146.

RADERMECKER, M., L. GOODFRIEND (1969):

Absorption of human γ G-globulin by a water-insoluble polymer of specific antiserum.

Immunochem. 6, 484-488.

REICHLIN, M., A. NISONOFF und E. MARGOLIASH (1970):

Immunological activity of cytochrom C. III. Enhancement of antibody detection and immune response initiation by cytochrom C polymers.

J. of Biol. Chem. 245, 947-954.

ROESSLER, W.G. und D.A. KAUTTER (1962):

Modifications to the Henderson-apparatus for studying airborne infections. Evaluation using aerosols of *Listeria monocytogenes*.
J. Infect. Dis. 110, 17-22.

SACHS, D.H., H.J. WINN (1970):

The use of glutaraldehyd as a coupling agent for ribonuclease and bovine serum albumin.

Immun. Chem. 7, 581-585.

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO, D.A.
DUNNERY und M.S. BERODOLL (1965):
Purification of staphylococcal enterotoxin B.
Biochem. 4, 1011-1016.

SCHEDLING, J. (1973):
Aerosole als Bestandteil der Air Pollution.
Proceedings First Intern. Congr. on Aerosole in Medicine,
Baden/Wien 19.-21.9.1973, 9-16.

SCHEFFLER, R. (1974):
Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Sociella burnetii* in Aerosolen durch das Impinger- und Gelatineverfahren.
Vet. Med. Diss., Gießen 1974.

SCHEVELEFF, P.P. (1911):
Zur Frage der aktiven Immunisierung gegen Diphtherie durch
die Luftwege (russ.).
Inaug. Diss., St. Petersburg 1911.

SCHÜTZLER, H. und W. DOCKHORN (1972):
Untersuchungen zur aerogenen Hyperimmunisierung und aerogenen
Hyperimmunserumbehandlung von Tieren. 1. Mitteilung: Versuche
an Pferden zur aerogenen Hyperimmunisierung mit Tetanusantigen
und zur aerogenen Behandlung mit Tetanushyperimmunserum.
Arch. Exp. Vet. 26, 12-14.

SCHUURS, A.H.W.M. und B.K. VAN WEEMEN (1977):
Review: Enzyme immunoassay.
Clinica Chimica Acta 81, 1-40.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

SEGAL, D.M. und E. HURWITZ (1976):
Dimers and trimers of immunoglobulin G covalently cross-linked
with a bivalent affinity label.
Biochem. 15, 5253-5258.

SEGAL, D.M., J.D. TAUROG und H. METZGER (1977):

Dimeric immunglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 2993-2997.

SEGAL, D.M., S.O. SHARROW, J.F. JONES und R.P. SIRAGANIAN (1981):
Fc(IgG)receptors on rat basophilic leukemia cells.

J. of Immun. 126, 138-145.

SELIVANOV, A.V. (1965):

L'immunisation des virus contre la Brucellose par aerosols avec le Vaccin de Souche 19 enphase liquide.

Bulletin 00. int. Epizoot. 63, 1125-1135.

SELIVANOV, A.V., F.V. ELISEEVA und Ch.G. KHASANOV (1975):

Retention und Verteilung von Aerosolvaccinen in den Lungen von Haustieren (russ.).

Dokl.vses. Akad. sel-khos. Nauk. 1, 28-29.

SELIVANOV, A.V. und V.V. MARINKOVA (1969):

Aerosolimmunisierung gegen Brucellose (russ.).

Veterinarija, Moskau, 12, 27-28.

SILBERSCHMIDT, W. (1934):

Immunisierungsversuche mittels Inhalation.

Schweiz. Med. Wschr. 64, 1089-1090.

SILVERMAN, S., D.A. ESPESETH und E.J. SCHANTZ (1969):

Effect of formaldehyd on the immunochemical and biological activity of staphylococcal endotoxin B.

J. of Bact. 98, 437-442.

SIMON, E. (1978):

Verfahren zum schnellen und empfindlichen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln am Modell des Enterotoxin B nach dem ELISA-Prinzip.

Vet.Med.Diss., München 1978.

SOLOVJOV, S.T. und B.A. LICHTMANN (1973):

Über eine aerogene und orale Ferkelimmunisierung gegen Rotlauf (russ.).

Veterinarija Kiew 36, 7-11.

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128-137.

SPERO, L., D.L. LEATHERMAN und W.H. ADLER (1975):

Mitogenicity of formalinized toxoids of staphylococcal enterotoxin B.

Inf. and Imm. 12, 1018-1020.

STÜHMER, A. (1975):

Untersuchungen über die Aerosolimmunisierung mit Rotlaufbakterien (erysipelothrox insidiosa) und Rotlaufbakterienfraktionen.

Nat. Diss., Hannover 1975

SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1953):

Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by monkey-feeding test.

J. Lab. Clin. Med. 41, 782-788.

THOTA, H., S.R. TATINI und R.W. BENNETT (1973):

Effects of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F.

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., p.1.

WARREN, J.R., L. SPERO und J.F. METZGER (1973):

Antigenicity of formaldehyde-inactivated staphylococcal enterotoxin B.

J. Immunol. 111, 885-892.

DIESELBEN (1974):

The pH-dependence of enterotoxin polymerization by formaldehyde.

Biochimica et Biophysica Acta 365, 434-438.

- WARREN, J.R., L. SPERO, J.F. METZGER und V.G. McGANN (1975):
Immunogenicity of formaldehyd-inactivated enterotoxins A and
C₁ of staphylococcus aureus.
J. of Inf.Dis. 131, 535-542.
- WHIGLEY, F.M., S.H. WOOD und R.H. WALDMAN (1969):
Aerosol immunization of humans with tetanus toxoid.
J. Immunol. 103, 1096-1098.
- WOLFE, E.K. (1961):
Quantitative characterization of aerosols.
Bact. Rev. 25, 194-202.
- YAMASHIROYA, H.M., R. EHRLICH und J.M. MAGIS (1966):
Aerosol-Immunization of guinea pigs with fluid tetanus toxoid.
J. Bact. 91, 903-904.
- ZAHN, H. (1955):
Angew. Chem. 67, 56.
- ZAHN, H. und D. WEGERLE (1960):
Kolloid-Z. 172, 29.

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. D.K. Hammer für seine fachliche Beratung meinen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere meiner Assistentin Frau Becker.

Für das Schreiben dieser Arbeit möchte ich mich auch bei Frau Spensberger herzlich bedanken.

Lebenslauf

Am 2. November 1950 wurde ich, Jutta Maschefsky, als einziges Kind des Werner Maschefsky und seiner Ehefrau Hedwig in Mannheim geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Sickinger-Volksschule in Mannheim. 1961 trat ich in das Elisabeth-Gymnasium Mannheim über, das ich 1965 aus Umzugsgründen verließ. Im April 1965 wechselte ich in das Sophie-Scholl II-Gymnasium München, das später in Willi-Graf-Gymnasium umbenannt wurde, über und schloß dort am 19.6.1971 mit dem Abitur ab.

Im Oktober 1971 nahm ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Tiermedizin auf. Im Oktober 1977 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

Seit Januar 1978 bin ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München tätig.

